

Reinfektionsversuche
steriler Larven von *Stegobium paniceum* L.
mit Fremdhefen und die Beziehungen
zwischen der Entwicklungsdauer der Larven
und dem B-Vitamingehalt des Futters
und der Hefen

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Francis H. Foeckler
aus
Washington, D. C., USA.

November 1960

Tag der mündlichen Prüfung: 30. November 1960

Dekan: Prof. Dr. RICHARD DEHM

1. Referent: Prof. Dr. ANTON KOCH

2. Referent: Prof. Dr. HANSJOCHEM AUTRUM



Sonderdruck aus
Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere,
Bd. 50, Heft 2, S. 119—162 (1961)
Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg

Aus dem Zoologischen Institut München

REINFEKTIONSVERSUCHE STERILER LARVEN
VON *STEGOBIUM PANICEUM* L. MIT FREMDHEFEN UND
DIE BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DER ENTWICKLUNGSDAUER
DER LARVEN UND DEM B-VITAMINGEHALT DES FUTTERS
UND DER HEFEN*

Von

FRANCIS FOECKLER

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. Dezember 1960)

Inhaltsübersicht

	Seite
A. Einleitung	120
B. Material und Methoden	122
I. Zur Biologie von <i>Stegobium paniceum</i> L.	122
II. Zur Biologie der Hefen	122
III. Haltung und Züchtung	124
IV. Technik	124
V. Bakteriologische Arbeitsmethoden	125
VI. Feststellung der larvalen Entwicklungszeit	125
C. Infektionsversuche steriler <i>Stegobium</i> -Larven mit Fremdhefen	126
I. Beschmierung der Eier mit Hefesuspensionen	126
II. Zugabe von Hefen zur Nahrung steriler Larven	127
1. Zugabe frischer Hefen S. 127. — 2. Zugabe getrockneter Hefen S. 128. — 3. Gleichzeitige Zugabe normaler <i>Stegobium</i> -Symbionten und getrockneter <i>Torulopsis utilis</i> S. 130.	
III. Tabellen und ihre Auswertung	131
1. Larvale Entwicklung S. 131. — 2. Beobachtungen an Im agines S. 133. — 3. Die F ₁ -Generation. a) Larvale Entwicklung S. 134. — b) Beobachtungen an F ₁ -Imagines S. 136.	
D. Histologische Untersuchungen an Tieren, die mit <i>Torulopsis utilis</i> infiziert wurden	137
I. Frisch infizierte Tiere	137
1. Larven S. 137. — 2. Imagines S. 143.	
II. Die F ₁ -Generation	146
1. Larven S. 146. — 2. Imagines S. 147.	
E. Bestimmung des relativen Vitamingehaltes des Futters und der Hefen	147
I. <i>Tribolium</i> -Test	147
II. Technik	147
III. Ergebnisse	148
1. Vitamingehalt des Futters und des Hefeextraktes S. 148. —	
2. Vitamingehalt der Hefen und der Nährböden S. 149.	
IV. Beziehungen zwischen Entwicklungsdauer der <i>Stegobium</i> -Larven und dem Vitamingehalt des Futters, des Hefeextraktes und der Hefen	153

* Herrn Prof. Dr. PAUL BUCHNER zu seinem 75. Geburtstag am 12. 4. 61 in Verehrung gewidmet.

F. Diskussion der Ergebnisse	154
Summary	158
Literatur	160

A. Einleitung

1899 beobachtete KARAWAIEW in den traubigen Anschwellungen am Anfang des Mitteldarmes des Brotkäfers *Stegobium (Sitodrepa) paniceum* L. körnchenhaltige Zellen. Da sich bei diesen „Körnchen“ scheinbar eine Kopulation feststellen ließ, und dieselben außerdem einseitig tränenförmig zugespitzt waren, hielt er diese Gebilde für parasitische Flagellaten. K. ESCHERICH (1900) erkannte richtig die Einschlüsse als Hefen und deutete den der Kopulation ähnlichen Vorgang als Sprossung. Die aus den Darmsäcken isolierten Organismen ließen sich von ihm sogar in Traubenzuckerlösung und auf Traubenzuckeragar kultivieren. PAUL BUCHNER (1921) und sein Schüler E. BREITSPRECHER (1928) beschrieben dann die genaueren Einzelheiten der symbiontischen Einrichtungen von *Stegobium paniceum*. Die symbiontischen Hefen bewohnen die Zellen der Mitteldarmblindsäcke von Larven und Imago dieses Käfers. Sie werden durch Beschmierung der Eier im Augenblick der Ablage auf die Nachkommen übertragen. Erst beim Schlüpfakt infizieren sich die bis dahin steril gebliebenen jungen Larven durch Fressen der mit symbiontenhaltigem Sekret besudelten Eischalen.

Nach der Definition PAUL BUCHNERS (1953) verstehen wir unter Endosymbiose „ein gesetzmäßiges Zusammenleben zweier verschieden gearteter Partner, bei dem der eine im Körper des anderen, zumeist wesentlich höher organisierten, Aufnahme findet, und die wechselseitige Anpassung einen solchen Grad der Innigkeit erreicht hat, daß die Vermutung berechtigt ist, es könne sich dabei um eine dem Wirtsorganismus nützliche Einrichtung handeln“.

Den Beweis, daß es sich bei den in *Stegobium paniceum* beobachteten Mikroorganismen wirklich um Symbionten im Sinne der Buchnerschen Definition handelt, d. h., daß die Hefen wirklich „eine für den Wirtsorganismus nützliche Einrichtung“ sind, führte A. KOCH (1933a, b). Zuerst gewann er symbiontenfreie Larven auf die Weise, daß er die Larven kurz vor dem Schlüpfen aus den Eischalen herauspräparierte. Dies hatte allerdings bei den Larven eine hohe Sterblichkeit zur Folge, obwohl sie auf Nährmedien (Erbswurst) gehalten wurden, denen getrocknete Hefe oder Weizenkeimlinge zugesetzt waren. Erst als er die Eischale durch Eintauchen der Eier in einer 5%igen Lösung von Chloramin in 70% Alkohol sterilisierte, gelang ihm die Aufzucht auf dem oben angegebenen Diätfutter. Sterile Larven auf Erbswurst allein starben nach kurzer Zeit. KOCH bewies damit die Lebensnotwendigkeit der Symbionten für *Stegobium paniceum* bzw. der von ihnen produzierten

Stoffe, die auch in getrockneten Hefen und Weizenkeimlingen vorhanden sind.

FRAENKEL u. BLEWETT (1943), BLEWETT u. FRAENKEL (1944) und PANT u. FRAENKEL (1954) zeigten, daß die normalen Larven für ihre Entwicklung Thiamin (Vitamin B₁) und β -Biotin benötigten. Symbiontenfreien Larven dagegen müssen zur Nahrung außer Thiamin und β -Biotin noch Riboflavin (Vitamin B₂), Pyridoxin (Vitamin B₆), Nicotinsäure, Pantothersäure und Folsäure zugesetzt werden. Dies bewies, daß die Symbionten zumindest einen Anteil an der Vitaminerzeugung im Wirtsorganismus hatten.

PANT u. FRAENKEL (1950, 1954) gelang es fernerhin, die Symbionten von *Stegobium paniceum* L. und *Lasioderma serricorne* F., zweier nahe verwandter Käfer, wechselseitig auszutauschen. Dies erfolgte durch Beschmierung der sterilisierten Eier mit den in Reinkultur gezogenen Symbionten der anderen Gattung und durch Fütterung der sterilen Larven mit denselben. Die mit den Hefen von *Lasioderma* infizierten *Stegobium*-Larven entwickelten sich in fast derselben Zeit wie mit ihren eigenen Symbionten. Das Wachstum der *Lasioderma*-Larven mit *Stegobium*-Symbionten aber wurde stark verzögert. Die Autoren führten dies auf eine ungenügende Thiaminlieferung der *Stegobium*-Hefen zurück.

1954 gelang es GRAEBNER, die *Stegobium*-Symbionten in vitro zu züchten. Seine Versuche ergaben, daß die Hefen Thiamin, Riboflavin, Pyridoxin, Folsäure, β -Biotin, Nicotinsäureamid und Pantothersäure enthalten. Weiter geben nach GRAEBNER die Mikroorganismen folgende Vitamine an das Nährmedium ab: Thiamin, Riboflavin, Pyridoxin, Folsäure und Pantothersäure. GRAEBNER tat noch ein Übriges. Er bestimmte die symbiontischen Hefen von *Stegobium paniceum* und ordnete sie als neue Spezies *buchnerii* der Gattung *Torulopsis* zu, da eine Zuordnung zu den bisher bekannten Arten aus morphologischen und physiologischen Gründen nicht möglich war.

Durch die geglückten Symbiontenaustausch-Versuche von PANT u. FRAENKEL war der Beweis erbracht worden, daß auch Fremdhefen sich in den Zellen der Mitteldarmblindsäcke steriler *Stegobium*-Larven ansiedeln. So schien es wünschenswert zu untersuchen, ob auch symbiontische Hefen anderer Insekten, sowie Kulturhefen als „Symbionten“ in sterilen *Stegobium*-Larven angesiedelt werden können. Dabei war auch auf die Art der Ansiedelung der Hefen und die Entwicklungsdauer der Larven zu achten. Schließlich erschien vom Blickwinkel der Vitaminproduktion der Hefen eine vergleichende Analyse symbiontischer und nichtsymbiontischer Hefen in diesem Zusammenhang von Interesse.

An dieser Stelle danke ich herzlich Herrn Prof. Dr. ANTON KOCH für die Themastellung sowie sein stetes Interesse am Fortgang der Untersuchungen.

Für die Überlassung des Arbeitsplatzes und die gewährten Unterstützungen schulde ich sowohl dem früheren Vorstand des Zoologischen Institutes, Herrn

Prof. Dr. KARL RITTER v. FRISCH, als auch dem jetzigen Vorstand, Herrn Prof. Dr. HANSJOCHM AUTRUM großen Dank.

B. Material und Methoden

I. Zur Biologie von *Stegobium paniceum* L.

Der Brotkäfer ist wohlbekannt als Schädling menschlicher Vorräte, wie Teigwaren, Backwerk, Reis, Schokolade und vieler Drogen. Er gehört der Unterfamilie der Anobiinen an und unterscheidet sich durch seine Lebensweise von allen anderen Vertretern dieser Gruppe, welche ausschließlich in Holz und zellulosereichen Pflanzenteilen leben. Die Larven und Imagines von *S. paniceum* beherbergen, wie alle Anobiiden, bei denen eine Symbiose festgestellt worden ist, ihre Hefen in sackartigen Ausstülpungen des Mitteldarms (Abb. 5a). Diese Blindsäcke überdecken die Übergangsstelle des Vorderdarms in den Mitteldarm. Sie sind sehr voluminös und von zahlreichen Tracheen umspinnen. Das Epithel dieser Mitteldarmblindsäcke setzt sich aus 2 Zellarten zusammen: den schlanken Darmepithelzellen mit Bürstenbesatz und den außerordentlich vergrößerten mit Hefen gefüllten Mycetocyten, bei denen wir einen Bürstensaum vermissen (Abb. 2a).

Die letzten Abdominalsegmente des *Stegobium*-Weibchens bilden den teleskopartig ausstülpbaren Legeapparat. Zwei Einrichtungen sind vorhanden, die dafür sorgen, daß die Eier bei der Ablage mit Hefen beschmiert werden. An der Stelle, wo der Legeapparat in die rückläufige Intersegmentalhaut übergeht, bildet diese jederseits einen Schlauch, der tief ins Körperinnere eindringt. Diese Schläuche sind mit Hefen gefüllt und drücken die Symbionten in die Scheide des Ovipositors. Außer diesen Schläuchen sind 2 Taschen am Ende des Legeapparates vorhanden, die gleichfalls Hefen enthalten¹. Die Eier werden während des Durchgleitens durch das Legerohr reichlich mit Symbionten beschmiert. Beim Schlüpfen fressen die Larven einen Teil der Schale und infizieren sich dadurch mit den Hefen, die dann von den für sie bestimmten Darmepithelzellen aufgenommen werden.

II. Zur Biologie der Hefen

Die Hefen gehören zu den Eumyceten, die eingeteilt werden in ascosporige (sporenbildende) und anascosporige (nichtsporenbildende) Hefen. An Stelle von Mycelien werden meistens nur Verbände von Sproß- und Spaltzellen gebildet. Die ascosporigen Hefen (Ascomyceten) leiten sich von den mycelbildenden Endomycetaceen ab. Die Ascosporigen entstehen unter Umwandlung einzelner Hefezellen in einen Ascus oder im Anschluß an eine Verschmelzung von 2 Zellen. Die

¹ Siehe BUCHNER 1953, Abb. 20, S. 121.

anascosporogenen Hefen werden in der umfangreichen Gruppe der Fungi imperfecti, welche keine Hauptfruchtform besitzen, zusammengefaßt.

Tabelle 1. Verbreitung der Hefen in verschiedenen Substraten (nach LUND)

Gattungen	Blüten	Früchte	Wurzel- ge- wächse	Blätter- schwäm- me	Baum- fluß	Insek- ten	Dün- ger	Boden
<i>Saccharomyces</i> . .	1	1	—	1	—	—	—	1
<i>Pichia</i>	—	—	—	—	—	—	—	2
<i>Hansenula</i>	1	—	1	—	—	1	1	5
<i>Hanseniaspora</i> . .	—	—	—	—	—	—	—	1
<i>Lipomyces</i>	—	—	—	—	—	—	—	1
<i>Cryptococcus</i> . . .	1	1	—	—	—	—	1	1
<i>Torulopsis</i>	10	2	3	1	3	5	—	5
<i>Schizoblastosporion</i>	—	—	—	—	—	—	—	1
<i>Candida</i>	9	6	4	4	6	6	3	6
<i>Kloeccera</i>	2	1	—	1	—	1	—	1
<i>Rhodotorula</i>	3	1	—	—	—	—	—	3
Zahl der								
Ascosporogenen	2	1	1	1	0	1	1	10
Zahl der								
Anascosporogenen	25	11	7	6	9	12	4	17

Die Zahlen geben die Artenanzahl innerhalb der Gattungen an.

Die Hefen sind überall in der Natur verbreitet. LUND (1954) untersuchte eingehend die Ökologie der Hefen. Tabelle 1 zeigt das Vorkommen verschiedener Arten in Blüten, Früchten, Wurzelgewächsen, Blätterschwämmen, Baumfluß, Insekten, Dünger und im Boden. Arten der Gattung *Torulopsis* und *Candida* kommen am häufigsten vor. GRAEBNER (1954), sowie KÜHLWEIN u. JURZITZA (1959) und JURZITZA, KÜHLWEIN u. KREGER-VAN RIJ (1960) stellten fest, daß die Symbionten der Cerambyciden der Gattung *Candida* angehören, während die Sproßpilze der Anobiiden zu der Gattung *Torulopsis* gestellt werden, den zwei in der Natur am häufigsten vorkommenden Hefe-Gattungen.

Zu den dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuchen wurden folgende Hefen herangezogen:

Ascosporigene Hefen

Endomyces magnusii LUDWIG
Hansenula californica WICKERHAM

Saccharomyces cerevisiae HANSEN
Saccharomyces cerevisiae HANSEN var.
ellipsoideus DEKKER
Saccharomyces pastorianus HANSEN
Sporobolomyces spec. (roseus) KLUYVER
 et VAN NIEL)
Zygosaccharomyces mayor TAK. et YUK.

Anascoporigene Hefen

Candida mesenterica DIDDENS et
 LODDER
Candida reukaufii DIDDENS et LODDER
Torulopsis albida LODDER
Torulopsis famata HARRISON
Torulopsis utilis LODDER
 Symbionten von *Rhagium bifasciatum*
 Symbionten von *Rhagium inquisitor*
 Symbionten von *Spondylis buprestoides*

Reinkulturen dieser Hefen verdanke ich dem Entgegenkommen der Herren Prof. Dr. R. GISTL, Technische Hochschule, München (*Sporobolomyces spec. Torulopsis utilis*, *Zygosaccharomyces major*), Prof. Dr. H. SCHANDERL, Botanisches Institut, Geisenheim (*Candida reukaufii*, *Endomyces magnusii*), Prof. Dr. S. WINDISCH, Institut für Gärungsgewerbe, Berlin (*Torulopsis jamata*), Dr. K. E. GRAEBNER, der ebenfalls im Zoologischen Institut der Universität München arbeitete, (*Saccharomyces cerevisiae*, Symbionten von *Rhagium bifasciatum*, *Rh. inquisitor* und *Spondylis buprestoides*, *Torulopsis albida*) und Dr. A. LUND, Tuborg-Laboratorium, Kopenhagen (*Candida mesenterica*, *Hansenula californica*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*).

III. Haltung und Züchtung

Als Zuchtgefäße wurden weithalsige Flaschen von 500 cm³ Inhalt benützt, die mit einem dünnen, mit Gummiring befestigten Leinenläppchen überdeckt wurden. Das Futter bestand aus einer Mischung von 45% Grieß, 45% Weizenmehl und 10% Zyma-Hefeextrakt¹. Optimale Zuchtbedingungen bot der Brutschrank bei 80% relativer Hydratur und einer konstanten Temperatur von 30° C. Für die Gewinnung steriler Larven und Insekten, sowie für die eigentlichen Versuche wurden kleine, mit je einem Wattepfropf verschlossene Tuben von 6×1 cm verwandt. Die Eigewinnung konnte mit zwei verschiedenen Methoden durchgeführt werden.

1. 30—40 Käfer wurden 24 Std in einer Tube mit Weizenmehl gehalten, die Imagines dann durch ein Teesieb von den Eiern und dem Mehl getrennt. Ein Sieb aus Müllergaze schied das Mehl von den Eiern.

2. Eine Anzahl (8—12) schwarzer Blättchen aus festem Papier, mit einem Durchmesser von etwa 7 cm, wurden übereinandergelegt und mit einer Büroklammer festgeklemt. Dieses Papierpäckchen kam in eine Petrischale, in der sich 60—80 Käfer befanden. Die Weibchen legten nun ihre Eier jeweils an den Rand der einzelnen Blättchen, die nach 24 Std herausgenommen wurden. Nach Entfernung der Büroklammer konnten die Eier, an verschiedenen Stellen in Gruppen bis zu 15 Stück liegend, gut beobachtet werden. Wie aus folgendem hervorgehen wird, bewährte sich die letzte Methode ausgezeichnet und diente deshalb während der gesamten Versuche zur Eigewinnung.

Zur Sterilisation wurden die von den Eiern belegten Teile der Blättchen abgeschnitten und nach 8 Tagen auf folgende Weise (s. KOCH 1933a, b) behandelt. Die jetzt schlüpfreifen Eier kamen samt ihrer Papierunterlage für 2 min in eine 5%ige Lösung von Chloramin in 70%igem Alkohol, daraufhin ins Wasserbad, welches einmal gewechselt wurde, und wurden dann auf Filtrierpapier abgetrocknet; $\frac{3}{4}$ der so behandelten Eier schlüpften 2—3 Tage später. Mit einem feinen Pinsel wurden jeweils 10 junge Larven in Tuben mit 45% Grieß, 45% Weizenmehl und 10% Zyma-Hefeextrakt übergeführt. Alle diese Larven entwickelten sich zu Imagines, 10% davon aber waren nicht steril, d. h. noch mit ihren Symbionten infiziert. Erst eine Verlängerung des Chloraminbades um 1 min ergab nur sterile Larven.

Die nach der ersten Methode gewonnenen Eier wurden in gleicher Weise behandelt, es blieben aber ungefähr 40% davon infiziert.

IV. Technik

Die Präparation der Darmblindsäcke der Larven und Käfer, sowie der Legenapparate der weiblichen Imagines, erfolgte mit Hilfe von nachgeschliffenen Näh-

¹ Ein Handelsprodukt (Extractum faecis spiss.) der Zyma-Blaes AG, München.

nadeln. Präpariert wurde in steriler Ringerlösung. Ausstrichsmedium für die Hefen war Leitungswasser. Die Ausstriche wurden mit einer 5%igen Lösung von Gentianaviolett in Wasser gefärbt. Alle benützten Instrumente, Glaswaren usw. wurden kurz vorher durch Istündiges Sterilisieren im Trockenschrank bei 165° C keimfrei gemacht.

Die Larven, die Imaginalblindsäcke und die Abdomina der Weibchen wurden im Gemisch nach BOUIN fixiert. Um ein besseres Eindringen der Fixierungsflüssigkeit zu gewährleisten, wurde der Kopf und ein kleiner Teil des Abdomens der Larven abgeschnitten. Eingebettet wurde in Paraffin (Schmelzpunkt 56° C). Die Schnittdicke betrug im Durchschnitt 6 μ . Zur Darstellung der in Frage kommenden Gewebe eignete sich am besten Hämatoxylin nach DELAFIELD und Gegenfärbung mit Erythrosin.

V. Bakteriologische Arbeitsmethoden

Um die Hefen in vitro zu züchten, war es nötig, die Blindsäcke und Intersegmentalschläuche unter den Kautelen sterilen Arbeitens in einem Tropfen sterilen Wassers auf einem Objektträger mit Nadeln zu zerzupfen. Mit der Platinöse wurden die Hefeaufschwemmungen in die Kulturgefäße überimpft.

Alle zur Züchtung benützten Glasgegenstände wurden mit Seifenlauge gesäubert, 48 Std lang in fließendem Wasser gewaschen und anschließend in destilliertem Wasser gespült. Sterilisation erfolgte durch 1/2stündiges Erhitzen auf 165° C im Trockenschrank. Als fester Nährboden wurde Nutrient-Agar (Difco), mit Zusätzen von 2% *Torulopsis*-Hefeextrakt und 2% Glucose, für flüssige Kulturen wurde Nutrient-Browth (Difco) mit denselben Zusätzen verwendet. Die Nährmedien wurden bei 123° C (1 atü) 15 min lang autoklaviert. Die Impfnadeln wurden durch Glühen in der Flamme des Bunsenbrenners sterilisiert. Schrägagarröhrchen eigneten sich am besten für Stammkulturen. Nutrient-Browth in Reagensgläsern diente als Nährmedium für die Blindsackhefen. Für Massenkulturen (zu Vitamin-testen) eigneten sich bestens Nutrient-Browth (Difco) mit 2% Glucose und Bierwürze¹ ohne Zusatz. Die ersten 48 Std nach der Beimpfung wurden die Kulturen im Temperaturschrank bei 30° C und in 80% Luftfeuchtigkeit gehalten, später im Schrank bei Zimmertemperatur. Für die Zubereitung der Nährböden verwendet man gewöhnliches Leitungswasser, das durch Abkochen einen Teil seines Kalkgehaltes verloren hat.

VI. Feststellung der larvalen Entwicklungszeit

Die Versuche, bei denen sterile Larven mit verschiedenen Fremdhafen infiziert wurden, erforderten zuerst die Feststellung der Entwicklungszeit

1. normaler *Stegobium*-Larven,
2. steriler *Stegobium*-Larven in einem Nährmedium, dem Hefeextrakt zugesetzt war.

In der Literatur über *Stegobium paniceum* L. widersprechen sich die angegebenen Entwicklungszeiten. Nach BREITSPRECHER (1928) erfolgte die Gesamtentwicklung normaler Tiere auf einer Mischung von Erbswurst, Nudeln und Reiskörnern in 66—74 Tagen bei 26—27° C (ohne Angabe von Luftfeuchtigkeit).

KOCH (1933a) kommt für die Entwicklung normaler Larven bis kurz vor der Verpuppung auf eine Zeit von 10 Wochen bei Aufzucht in Zimmertemperatur. Als Nährmedium benutzte er Erbswurst. Sterile Larven ebenfalls auf Erbswurst, der 10% Zyma-Hefeextrakt zugesetzt war, brauchten dagegen nach KOCHs Angaben (1933b) nur 36 Tage bei 31,5° C und optimaler Luftfeuchtigkeit.

¹ Ungehopfte Würze mit 18% Extraktgehalt, freundlicherweise vom Betriebslaboratorium der Löwenbräu AG, München, zur Verfügung gestellt.

BLEWETT u. FRAENKEL (1944) gaben die Entwicklungsdauer normaler und steriler Larven bis zur Imago auf Vollkornmehl mit 37—42 bzw. 42—52 Tagen an. Auf einem englischen Mehl von 75% Ausmahlung betrug die Entwicklungszeit 44—50 Tage für normale Larven, und erst nach 60 Tagen entwickelten sich zwei von 20 sterilen Larven zur Imago. Eine Beschleunigung rief ein Zusatz von 10% Hefe hervor. Die Entwicklung betrug dann auf Vollkornmehl 34—39 Tage für normale Larven, und 35—40 Tage für sterile Larven. Auf Mehl von 75% Ausmahlung brauchten jetzt normale Larven nur 37—44 Tage für ihre Entwicklung und sterile Larven 36—45 Tage. Diese Versuche wurden bei 25° C und 70% relativer Hydratur durchgeführt.

KLARA WOLF (1922) fand, daß normale *Stegobium*-Larven im Winter eine Ruhezeit durchmachen, und sich erst im Frühjahr verpuppen. Eigene Beobachtungen bestätigten diese Angabe. So konnte mit den Tieren nur von Anfang Mai bis Mitte Dezember gearbeitet werden.

In meinen Versuchen ließen sich die in Tabelle 2 angegebenen Entwicklungszeiten feststellen. Als Nährmedium wurde verwendet: Weizenmehl der Type 813 (Tivoli), Weizengrieß (Steinmetz), eine Mischung von Grieß 50% und Weizenmehl 50% und eine Grieß-Weizenmehl-Hefeextrakt-Mischung im Verhältnis 45:45:10. Wie oben bereits erwähnt, wurden alle Versuche im Brutschrank bei 30° C und 80% Luftfeuchtigkeit durchgeführt.

Der Unterschied in der Entwicklungsdauer normaler Larven ist auf den verschiedenen Vitamingehalt des Substrates zurückzuführen. Die Symbionten allein liefern dem Wirtsorganismus die in Diäten von Grieß und Weizenmehl fehlenden Vitamine nicht reichlich genug, um die optimale Entwicklungszeit in der mit Hefeextrakt ergänzten Diät zu erreichen. Tabelle 8 zeigt den Vitamingehalt von Weizenmehl, Grieß und Zyma-Hefeextrakt, Tabelle 9 den Vitamingehalt der normalen *Stegobium*-Symbionten.

Tabelle 2. Entwicklungsdauer normaler und steriler *Stegobium*-Larven in verschiedenen Diäten

Diät	Entwicklungsdauer normaler Larven	Zahl der geschlüpften Imagines	Entwicklungsdauer steriler Larven	Zahl der geschlüpften Imagines
Weizengrieß . . .	54—60 Tg. 56,2*	48	alle eingegangen	0
Weizenmehl (Type 812) . . .	47—53 Tg. 49,5*	49	alle eingegangen	0
Grieß (50%) . . .	50—55 Tg. 52,6*	48	alle eingegangen	0
Weizenmehl (50%)				
Grieß (45%) . . .	32—37 Tg. 34,4*	48	32—38 Tg. 34,5*	47
Weizenmehl (45%)				
Hefeextrakt (10%)				

Entwicklungsdauer in Tagen von frisch geschlüpften Larven bis zur Metamorphose. In jede Diät wurden 50 Larven eingesetzt.

* 50% der Imagines geschlüpft bis zum ... Tage.

C. Infektionsversuche steriler *Stegobium*-Larven mit Fremdhefen

I. Beschmierung der Eier mit Hefesuspensionen

PANT u. FRAENKEL (1950, 1954) gelang es, die Symbionten von *Stegobium* und *Lasioderma* auszutauschen. Sie beschmierten entweder

die sterilen Eier mit den in Reinkultur gezogenen Symbionten, oder setzten sie der Nahrung der sterilen Larven zu. Für meine eigenen Versuche kam zuerst die Methode der Ei-Beschmierung zur Anwendung.

Nach 48stündigem Wachstum auf frisch angesetzten Strichkulturen im Brutschrank bei 30° C und in 80% Luftfeuchtigkeit wurde eine Öse voll Hefen mit sterilem Leitungswasser in gleichfalls sterilen Uhrgläsern zu einer Suspension verrührt. Mit einem feinen, sterilen Pinsel wurden die schlüpfreifen Eier mit der Hefesuspension beschmiert. Die Eier stammten von sterilen Tieren, die aus sterilisierten Eiern schlüpften und sich in Diäten mit Hefeextrakt zu Imagines entwickelten. Die so behandelten Eier wurden auf einem sterilen Uhrglas in eine feuchte Kammer gebracht, um ein Austrocknen der frischen Hefekeime zu verhindern. Die eine Hälfte der frisch geschlüpften Larven wurde mit einem sterilen Pinsel in Tuben mit einer Mischung von Grieß und Weizenmehl (50:50) übergeführt, die andere Hälfte in Grieß, Weizenmehl und Hefeextrakt (45:45:10). Jeder Versuch wurde mit 60 Eiern durchgeführt, von denen 10 unbeschmiert blieben. Die geschlüpften Larven dieser Eier kamen zur Kontrolle der Sterilität in ein Grieß, Weizenmehl und Hefeextrakt enthaltendes Gemisch (45:45:10).

Der Beweis, daß die schlüpfenden Larven lebende Hefen mit der Eischale fraßen, ließ sich auf folgende Weise führen: die zurückbleibenden Eischalen kamen in einen flüssigen Nährboden und hier zeigte sich innerhalb 48 Std ein starkes Wachstum. Ausstriche davon zeigten die typischen Formen der Versuchshefen.

Alle Larven in Grieß und Weizenmehl starben noch vor der ersten Häutung. Sowohl die Larven von beschmierten als auch die von unbeschmierten Eiern entwickelten sich in Grieß, Weizenmehl und Hefeextrakt in 32—37 Tagen zu Imagines. Histologische Schnitte ergaben bei allen Larven und Imagines nur sterile Blindsäcke. Wurden flüssige Nährböden mit den zerzupften Darmblindsäcken und Därmen beimpft, erfolgte kein Wachstum der Versuchshefen. Die Larven waren, wie auch dann das histologische Bild ergab, steril.

Diese Ergebnis läßt vermuten, daß die mit der Eischale in den Darm gelangten Hefen sofort verdaut wurden. Die Larven in Grieß und Weizenmehl ohne Zusatz von Hefeextrakt gingen infolge des Vitaminmangels zugrunde, während die Tiere in Diäten mit Hefeextrakt ihren Wuchsstoff-Bedarf decken konnten und gediehen.

II. Zugabe von Hefen zur Nahrung steriler Larven

1. Zugabe frischer Hefen. Die Methode, durch Eibeschmierung die sterilen Larven zu infizieren, führte zu keinem Erfolg. Eine weitere Infektionsmöglichkeit bot die Beigabe frischer Hefen zum Futter. Frisch angesetzt, 48 Std alte Schrägagarhefekulturen wurden mit der Öse

restlos abgestreift und in einer sterilen Reibschale mit dem Futter vermengt.

Das Mischungsverhältnis für

Testdiät I betrug: Grieß 45% zu Weizenmehl 45% zu Hefe 10%.

Testdiät II setzte sich aus 40% Grieß, 40% Weizenmehl, 10% Hefe und 10% Zyma-Hefeextrakt zusammen.

Diät III, Grieß 45%, Weizenmehl 45% und Zyma-Hefeextrakt 10% ohne Zusatz lebender Hefen, diente als *Test-* und *Kontrolldiät*.

Testdiät IV bestand aus 50% Grieß und 50% Weizenmehl.

Jeder Versuch wurde mit 160 sterilen, frisch geschlüpften Larven im Brutschrank bei 30° C und 80% relativer Hydratur durchgeführt. Je 70 Larven kamen in die Diäten I und II (pro Tube 10 Tiere), 20 Larven in Kontrolldiät III. Nach 2 Wochen wurden aus den Testdiäten I und II 20 Larven in Testdiät III und 20 in Testdiät IV übergeführt. Je 50 Tiere blieben in den Testdiäten I und II zurück. Es bestand so die Möglichkeit, daß die Larven, die plötzlich von ihrer gewohnten Hefequelle entfernt wurden, die restlichen, lebendigen Hefen im Darm in die Mitteldarmblindsackzellen aufnehmen würden.

Fast alle Larven in Diäten I, II und III wuchsen zu Imagines heran. Eine geringe Zahl (3%) starb, wahrscheinlich durch mechanische Verletzungen der sehr zarten Fälarven. Die Tiere, die nach 2 Wochen aus den Testdiäten I und II in Testdiät IV übertragen wurden, starben innerhalb von 2 Wochen. Diejenigen aber, die in Testdiät III (mit Zusatz von Hefeextrakt) kamen, wuchsen erwartungsgemäß zu Imagines heran, und zwar in 33—40 Tagen. Dieselbe Entwicklungsdauer hatten die Larven in Testdiäten I und II (mit Zusatz von 10% Hefe).

Histologische Schnitte ergaben bei allen Larven und Imagines nur *sterile* Darmblindsackzellen. Daß sich aber im Darmlumen der Tiere aus Testdiäten I und II Kulturhefen befinden mußten, ergaben folgende Versuche. Der vordere Darmabschnitt mit seinen Blindsäcken wurde zerrissen und in flüssigen Nährboden übertragen. Nach 2—5 Tagen zeigten sich jedesmal die typischen Wachstumsformen der in den Versuchen verwendeten Hefen. Einmal in der Woche durchgeführte Übertragungen von Futter aus den Diäten I und II auf Nährböden ergaben, daß die den Diäten zugesetzten Hefen während der ganzen Versuchsdauer am Leben blieben. Aus zerzupften Därmen von Tieren, die aus den Testdiäten I und II in die Testdiäten III und IV übertragen, nach 7 Tagen präpariert und auf flüssigen Nährböden überimpft wurden, konnten niemals Hefen herausgezüchtet werden.

2. Zugabe getrockneter Hefen. Um sterile Tiere am Leben zu erhalten, wurde bis jetzt immer Zyma-Hefeextrakt zum Futter gegeben. Doch erschien es mir ratsam, noch ein zweites Hefepräparat im Laufe der Versuche zur Untersuchung heranzuziehen. Larven aus sterilisierten Eiern

kamen in Tuben mit 45 % Grieß, 45 % Weizenmehl und 10 % Futterhefe, die in den Aschaffener Zellstoffwerken aus getrockneter *Torulopsis utilis* hergestellt war¹. Aus diesen Versuchsreihen wurden, wie gewöhnlich, in gewissen Zeitabständen einige Larven herausgenommen, fixiert und geschnitten, um zu prüfen, ob sie völlig symbiontenfrei waren. Dabei stellte sich heraus, daß diese Tiere in *sämtlichen* Mitteldarmzellen Hefen aufgenommen hatten, die ganz anders aussahen als die normalen Symbionten. Dieses Ergebnis war völlig überraschend, da in diesem Falle die Schranke gefallen war, die normalerweise zwischen dem besiedelten Blindsackepithel und den angrenzenden immer steril bleibenden Darmzellen besteht (Abb. 5b).

Impfungen der zerzupften Mitteldarmblindsäcke und Därme dieser Larven auf flüssigem Nährboden ergaben nach 48 Std reine Kulturen von *Torulopsis utilis*. Es mußte also ein Teil der in dem Trockenpräparat enthaltenen Hefezellen trotz der Hitzebehandlung und der langen Lagerung seine Keimkraft bewahrt haben. Dies bewiesen auch Kontrollversuche, die ich daraufhin mit dem gleichen Futterhefepräparat ansetzte, das nach Überimpfung auf flüssige Nährböden schon nach 48 Std Bebrütung lebhaftes Sproßwachstum zeigte.

Auf Grund dieser Erfahrungen änderte ich die künftigen Versuche in der Weise ab, daß ich die für Reinfektionsversuche zu verwendenden Hefen in getrocknetem Zustand den Diäten beimengte.

Dabei ging ich folgendermaßen vor: Je 1 Liter flüssiger Nährboden wurde mit Hefen jeder Stammkultur beimpft. Nach einer Wachstumszeit von 2 Monaten kamen die Hefen, die durch Dekantieren und Zentrifugieren vom Nährsubstrat getrennt wurden, in flache Porzellanschalen und blieben darin zur Austrocknung 48 Std im Thermostaten bei 40° C.

Jetzt wurden mit denselben Testdiäten, den gleichen Mengenverhältnissen und derselben Anzahl der Versuchstiere die in Teil B 1 beschriebenen Versuche wiederholt. Allein statt frischer Hefen kamen als Zugabe zu den Futterdiäten getrocknete Hefen aller in diesen Versuchen bisher verwendeter Spezies zur Anwendung.

Die Ergebnisse mit diesem Verfahren glichen in allen Punkten, mit einer einzigen Ausnahme, den vorher beschriebenen Versuchen. Diese Ausnahme bildeten jene Larven, die in Diäten mit *Torulopsis utilis* wuchsen und bei denen sich wiederum Hefen in Darmzellen und Blindsackzellen feststellen ließen. 19 der 20 Larven, die nach 2 Wochen aus Testdiät I (Grieß, Weizenmehl und getrockneter *Torulopsis utilis*) in Testdiät IV (Grieß und Weizenmehl ohne Zusatz) kamen, entwickelten sich zu Imagines; dies war auf Grund der bleibenden Infektionen mit

¹ Es handelt sich um ein Präparat, das bei 120° C auf dem Walzentrockner getrocknet und schon 4 Jahre lang im Institut gelagert war.

T. utilis auch zu erwarten. Aber die histologisch untersuchten Blindsäcke und Därme aller Imagines waren steril. Daß doch in einigen Blindsäcken und Därmen mit *T. utilis* infizierten Tiere noch lebende Hefezellen vorhanden waren, haben Kulturversuche bewiesen. Aus zerzupften Blindsäcken und Mitteldärmen konnten in solchen Fällen die zur Infektion verwendeten Hefen (*T. utilis*) innerhalb 5 Tagen herausgezüchtet werden. Auf histologischen Schnitten erwiesen sich sowohl die Intersegmentalschläuche als auch die Vaginaltaschen der Weibchen als leer und alle Kulturversuche blieben negativ.

Daß auch alle getrockneten Hefen während der gesamten Versuchsdauer am Leben blieben, zeigten regelmäßig durchgeführte Kulturversuche der Hefezellen aus Darm und Futter.

3. Gleichzeitige Zugabe normaler *Stegobium*-Symbionten und getrockneter *Torulopsis utilis*. Es erhoben sich nun zwei interessante Fragen:

1. Wie würde das Infektionsbild in sterilen Larven aussehen, denen gleichzeitig ihre normalen Symbionten und getrocknete *Torulopsis utilis* angeboten werden?

2. Wie würden normal infizierte *Stegobium*-Larven auf eine Diät mit getrockneter *T. utilis* reagieren?

In der ersten Versuchsreihe wurden frisch geschlüpfte, *sterile* Larven, die von sterilen Tieren stammten, welche aus sterilisierten Eiern schlüpften und in Diäten mit Hefeextrakt zu Imagines heranwuchsen, in einer Diät aus Grieß und Weizenmehl mit Zusatz von 10% getrockneter *T. utilis* aufgezogen, worin sich vor der Zugabe von *T. utilis* bereits normale Larven zu Imagines entwickelt hatten. Das Nährsubstrat war also mit arteigenen aus dem Kot normal infizierter Larven stammenden Symbionten, sowie mit getrockneter *T. utilis* infiziert.

In der zweiten Versuchsreihe wurden frisch geschlüpfte, *normale* Larven in ein Grieß-Weizenmehl-Gemisch mit Zusatz von 10% getrockneter *T. utilis* übertragen.

Histologische Schnitte verschiedener Wachstumsstadien von Larven dieser beiden Versuchsreihen zeigten das typische Bild einer normalen Infektion mit *Stegobium*-Symbionten. Die Mycetocyten der Blindsäcke waren mit arteigenen Symbionten besiedelt, die Zwischenzellen derselben waren steril; auch die sämtlichen Mitteldarmepithelzellen waren *nicht* mit *T. utilis* infiziert.

Daraus kann man schließen, nicht nur daß die *Stegobium*-Larven ihre arteigenen Symbionten der *T. utilis* vorziehen, sondern auch, daß eine Besiedlung der Mycetocyten mit normalen Symbionten sowohl die Zwischenzellen der Blindsäcke als auch das Epithel des Mitteldarms vor einer Infektion mit *T. utilis* schützt.

III. Tabellen und ihre Auswertung

1. **Larvale Entwicklung.** Die Entwicklungsdauer der Larven in Diäten mit 10 % frischen oder getrockneten Hefen glich jener der Larven in Diäten mit 10 % Hefeextrakt (33—40 Tage). Um Unterschiede in den Entwicklungszeiten zu erzielen, mußten die Hefen geringer dosiert werden. Jetzt wurden mit denselben Testdiäten und derselben Anzahl der Versuchstiere die in Teil II, 1 beschriebenen Versuche wiederholt. Allein statt 10 % Hefe kam diesmal 5 % getrocknete Hefe zu den Testdiäten I und II.

Tabelle 3. Larvale Entwicklungsdauer in Testdiäten I und II
mit Zusatz verschiedener Hefen

Hefe ¹	Entwicklungsdauer in Testdiät I ²	Zahl der geschlüpf- ten Imagines	Entwicklungsdauer in Testdiät II ²	Zahl der geschlüpf- ten Imagines
<i>Torulopsis albida</i> .	32—38 Tg. 34,8*	48	32—38 Tg. 34,8*	48
<i>Sporobolomyces</i> spec.	32—38 Tg. 34,9*	48	32—38 Tg. 34,6*	49
<i>Torulopsis famata</i> .	33—39 Tg. 35,4*	49	32—37 Tg. 34,7*	49
<i>Saccharomyces</i> <i>pastorianus</i> . . .	33—40 Tg. 35,8*	49	32—38 Tg. 34,9*	47
<i>Torulopsis utilis</i> . .	34—40 Tg. 36,5*	49	32—38 Tg. 34,8*	49
<i>Zygosaccharomyces</i> <i>major</i>	34—41 Tg. 36,9*	47	32—37 Tg. 34,6*	48
<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	35—40 Tg. 37*	48	32—38 Tg. 35,2*	48
Symbionten aus <i>Rhagium bifas-</i> <i>ciatum</i>	36—42 Tg. 38,5*	48	32—37 Tg. 34,7*	49
Symbionten aus <i>R. inquisitor</i> . . .	36—43 Tg. 38,8*	49	32—38 Tg. 34,9*	49
<i>Candida reukaufii</i> .	37—43 Tg. 39,3*	49	32—37 Tg. 34,6*	48
<i>Hansenula cali-</i> <i>formica</i>	37—43 Tg. 39,6*	49	32—38 Tg. 34,9*	47
<i>Endomyces magnusii</i>	37—44 Tg. 39,9*	47	32—38 Tg. 34,8*	48
<i>Saccharomyces cere-</i> <i>visiae</i> var. <i>ellipso-</i> <i>ideus</i>	38—43 Tg. 40,7*	48	32—37 Tg. 34,6*	49
Symbionten aus <i>Spondylis bupres-</i> <i>toides</i>	40—49 Tg. 43,9*	48	32—38 Tg. 35,1*	40
<i>Candida mesenterica</i>	60—70 Tg. 64,2*	47	32—37 Tg. 34,5*	49

Entwicklungsdauer in Tagen von frisch geschlüpften Larven bis zur Metamorphose. — In jede Diät wurden 50 Larven eingesetzt.

* 50 % der Imagines geschlüpft bis zum ... Tage.

¹ 50 mg getrocknete Hefe pro 950 mg Diät.

² Grieß, Weizenmehl und Hefe.

³ Grieß, Weizenmehl, Hefeextrakt und Hefe.

Die kürzeste Entwicklungszeit, 32—38 Tage, hatten die Larven, deren Diäten die Hefen *Torulopsis albida* und *Sporobolomyces* spec.

zugesetzt wurden. Am langsamsten wuchsen die Larven in Diäten mit *Candida mesenterica* (60—70 Tage). Zusatz der anderen Hefen ergaben Entwicklungszeiten zwischen 33 und 49 Tagen.

Dieses Ergebnis zeigt, daß die sterilen Larven in Grieß und Weizenmehl mit 5% Hefe ihren Vitaminbedarf zumindest so gut decken konnten, daß sie ihre Entwicklung vollendeten. Die Verschiedenheit der Entwicklungszeiten ist auf den ungleichen Vitamingehalt der verschiedenen Hefesorten zurückzuführen. Aus den Tabelle 10 und 11 ist der Vitamingehalt der getesteten Hefen zu entnehmen. Dieser Aspekt des Problems soll in Kapitel E ausführlich behandelt werden.

Die Entwicklungszeiten der Larven, die nach 2 Wochen aus den Testdiäten I und II in die Testdiäten III und IV übergeführt wurden, zeigt Tabelle 4. In Testdiät IV (Grieß und Weizenmehl ohne Zusatz) wuchsen nur Larven aus Diäten mit getrockneter *Torulopsis utilis* und mit Futterhefe (Handelsprodukt aus *T. utilis*) zu Imagines heran, und zwar in 50—56 Tagen. Alle anderen starben innerhalb von 2 Wochen. Alle Larvenstadien bis zur Verpuppung, welche sowohl aus den Diäten I und II (mit Zusatz von getrockneter *T. utilis*), als auch aus den Diäten III und IV (ohne Zusatz) kamen, zeigten sich auf histologischen Schnitten mit *T. utilis* infiziert.

Tabelle 4. *Larvale Entwicklungsdauer in Testdiäten III und IV*

Hefe ¹	Entwicklungsdauer in Testdiät IV (Grieß und Weizen- mehl)	Zahl der geschlüpf- ten Imagines	Entwicklungsdauer in Testdiät III (Grieß, Weizenmehl und Hefeextrakt)	Zahl der geschlüpf- ten Imagines
<i>Torulopsis utilis</i> , getrocknet . . .	51—56 Tg. 52,5*	19	33—40 Tg. 35,8*	19
Futterhefe (Handelsprodukt aus <i>T. utilis</i>) . .	50—56 Tg. 52,2*	19	34—39 Tg. 35,2*	18
<i>Torulopsis utilis</i> , frisch	alle gestorben in 11—14 Tagen	0	34—40 Tg. 35,5*	19
Alle anderen ge- testeten Hefen, frisch und ge- trocknet	alle gestorben in 11—15 Tagen	0	33—40 Tg. 35,9*	525

Entwicklungsdauer in Tagen von frisch geschlüpften Larven bis zur Metamorphose.

* 50% der Imagines geschlüpft bis zum ... Tage.

¹ Von jeder Testdiät I und II, mit frischen und mit getrockneten Hefen, wurden je 10 Larven nach 2 Wochen in Testdiäten III und IV übertragen.

Aus Tabelle 4 ersicht man, daß die in Testdiät III übertragenen Larven zwischen 33 und 38 Tagen zu Imagines heranwuchsen. Dies war auf Grund des Hefeextrakt-Zusatzes zum Futter zu erwarten.

2. Beobachtungen an Imagines. Es war nun interessant zu wissen, wie lange die Imagines aus diesen Versuchen in den verschiedenen Diäten leben. Tabelle 5 zeigt die Lebensdauer der Imagines in den Testdiäten mit getrockneten Hefen, in welchen ihre gesamte Larvalentwicklung stattfand, in Grieß und Weizenmehl und in Grieß, Weizenmehl und Hefeextrakt.

Tabelle 5a. *Lebensdauer der Imagines*¹,

die in Testdiäten I und II (mit getrockneten Hefen) aufgewachsen sind und welche nachträglich auf Testdiäten I und II, auf Grieß und Weizenmehl und auf Grieß, Weizenmehl und Hefeextrakt gehalten wurden.

Testdiät I	Testdiät II	Gleich nach dem Schlüpfen in Testdiät I auf		Gleich nach dem Schlüpfen in Testdiät II auf	
		Grieß und Weizenmehl	Grieß, Weizenmehl, Hefeextrakt	Grieß und Weizenmehl	Grieß, Weizenmehl, Hefeextrakt
9—21 Tg. 17,8*	10—20 Tg. 17*	9—21 Tg. 17,9*	10—20 Tg. 17,2*	10—21 Tg. 18*	9—20 Tg. 17,1*

In jeder Testdiät blieben 10 Tiere zurück, und je 10 kamen auf Grieß und Weizenmehl und auf Grieß, Weizenmehl und Hefeextrakt.

Gesamtzahl der beobachteten Imagines: 840.

* 50% der Imagines gestorben bis zum ... Tage.

In allen Diäten betrug die Lebensdauer der Imagines 9—21 Tage. Der gleiche Spielraum gilt auch für die Lebensdauer normal infizierter Tiere. Auch sterile Imagines, die in einem Gemisch von Grieß, Weizenmehl und Hefeextrakt aufgezogen wurden, zeigten dieselbe Lebenszeit, gleichgültig ob sie nachträglich auf Grieß und Weizenmehl mit oder ohne Hefeextrakt gehalten wurden. Alle beobachteten Tiere legten Eier in jeder Art des Futters ab, und zwar, wie normale Imagines, am 2., 3. oder 4. Tag.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Symbionten nur für die larvale Entwicklung auf Grieß und Weizenmehl notwendig sind. Die

Tabelle 5b. *Lebensdauer der Imagines*¹ die nach 2 Wochen von den Testdiäten I und II (mit getrockneten Hefen) in Testdiät III (mit Zusatz von 10% Hefeextrakt) kamen, auf Testdiät III, auf Grieß und Weizenmehl und auf Grieß, Weizenmehl und Hefeextrakt.

Testdiät III	Gleich nach dem Schlüpfen in Testdiät III auf	
	Grieß und Weizenmehl	Grieß, Weizenmehl, Hefeextrakt
10—21 Tg. 17,4*	9—21 Tg. 18*	10—20 Tg. 17,2*

In jeder Testdiät blieben 5 Tiere zurück und je 5 kamen auf Grieß und Weizenmehl und auf Grieß, Weizenmehl und Hefeextrakt.

Gesamtzahl der beobachteten Imagines: 210.

* 50% der Imagines gestorben bis zum ... Tage.

¹ Ausgenommen die Imagines von Diäten mit getrockneter *Torulopsis utilis*. Diese Ergebnisse sind in Abteilung c der Tabelle dargestellt.

Tabelle 5c. *Lebensdauer der Imagines*,
die in Testdiäten I und II mit getrockneter *Torulopsis utilis* infiziert wurden,
auf verschiedenem Futter

Testdiät I	Testdiät II	Gleich nach dem Schlüpfen in Testdiät I auf		Gleich nach dem Schlüpfen in Testdiät II auf	
		Grieß und Weizenmehl	Grieß, Weizenmehl, Hefeextrakt	Grieß und Weizenmehl	Grieß, Weizenmehl, Hefeextrakt
10—20 Tg. 17,6*	9—21 Tg. 18,1*	9—20 Tg. 18*	11—20 Tg. 17,5*	12—21 Tg. 17,7*	10—20 Tg. 17,9*

Testdiät III	Testdiät IV	Gleich nach dem Schlüpfen in Testdiät III auf		Gleich nach dem Schlüpfen in Testdiät IV auf	
		Grieß und Weizenmehl	Grieß, Weizenmehl, Hefeextrakt	Grieß und Weizenmehl	Grieß, Weizenmehl, Hefeextrakt
10—21 Tg. 18*	12—20 Tg. 17,8*	10—20 Tg. 17,6*	11—21 Tg. 18,1*	9—20 Tg. 17,6*	12—21 Tg. 17,9*

In jeder Testdiät blieben 10 Tiere zurück und je 10 kamen auf Grieß und Weizenmehl, und Grieß, Weizenmehl und Hefeextrakt.

Gesamtzahl der beobachteten Tiere: 120.

* 50% der Imagines gestorben bis zum ... Tage.

Tabelle 5d. *Lebensdauer der Imagines*

Kontrolle: Lebensdauer normaler und steriler Imagines auf Grieß und Weizenmehl und auf Grieß, Weizenmehl und Hefeextrakt.

Normale Imagines auf		Sterile Imagines auf	
Grieß und Weizenmehl	Grieß, Weizenmehl, Hefeextrakt	Grieß und Weizenmehl	Grieß, Weizenmehl, Hefeextrakt
9—21 Tg. 18*	10—21 Tg. 18,1*	9—21 Tg. 17,9*	9—20 Tg. 17,4*

Die hier beobachteten sterilen Imagines stammten von sterilisierten Eiern, und wurden in Grieß, Weizenmehl und Hefeextrakt bis zur Metamorphose gebracht.

Gesamtzahl der beobachteten Imagines: 200 (auf jedem Futter 50 Tiere).

* 50% der Imagines gestorben bis zum ... Tage.

Lebensdauer der Imagines auf demselben Futter ist von dem Vorhandensein der Symbionten unabhängig.

3. Die F_1 -Generation.

a) *Larvale Entwicklung.*
Je 30 frisch geschlüpfte Larven von Eiern der in Teil III, 2 behandelten Imagines kamen in Tuben mit Grieß und Weizenmehl, je 10 Larven in dieselbe Diät mit 10% Hefeextrakt. Tabelle 6 zeigt die Entwicklungszeiten der F_1 -Larven.

Die symbiontenfreien Larven aus sterilisierten Eiern wuchsen in Grieß, Weizenmehl und Hefeextrakt zu Imagines heran. Die Larven aus den Eiern dieser Imagines, also die F_1 -Generation, starben vor der ersten Häutung in Grieß und Weizenmehl ohne Zusatz (s. Tabelle 4, Kontrolle). Das gleiche geschah bei gleicher Versuchsanordnung bei der F_1 -Generation, sofern die Larven der Parentalgeneration in Testdiäten mit folgen-

den getrockneten Hefen aufwuchsen: *Candida reukaufii*, *Hansenula californica*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *Sporobolomyces spec.*, Symbionten aus *Rhagium bifasciatum*, Symbionten aus *Rh. inquisitor* und Symbionten aus *Spondylis buprestoides*.

Überraschenderweise wuchs ein kleiner Teil der sterilen F₁-Larven zu Imagines aus, wenn folgende getrocknete Hefen zum Futter der

Tabelle 6. Entwicklungsdauer der F₁-Larvengeneration

Hefe ¹	Grieß und Weizenmehl	Zahl der geschlüpften Imagines	Kontrolle: Grieß, Weizenmehl, Hefeextrakt	Zahl der geschlüpften Imagines
<i>Candida reukaufii</i> . .	alle eingegangen	0	32—38 Tg.	10
<i>Hansenula californica</i>	alle eingegangen	0	33—37 Tg.	10
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i>	alle eingegangen	0	32—36 Tg.	9
<i>Sporobolomyces spec.</i>	alle eingegangen	0	32—37 Tg.	10
Symbionten aus <i>Rh. bifasciatum</i> . .	alle eingegangen	0	32—38 Tg.	9
Symbionten aus <i>Rh. inquisitor</i> . .	alle eingegangen	0	32—38 Tg.	10
Symbionten aus <i>Spondylis buprestoides</i>	alle eingegangen	0	32—37 Tg.	10
<i>Torulopsis utilis</i> . .	60—70 Tg. 63,5*	29	33—37 Tg.	9
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	70 (1), 72 (1), 75 (1), 76 (1), 80 (1) Tg.	5	32—37 Tg.	10
<i>Torulopsis albida</i> . .	70 (1), 73 (2), 77 (1), 81 (1) Tg.	5	32—36 Tg.	10
<i>Endomyces magnusii</i>	70 (1), 76 (1), 84 (1) Tg.	3	32—38 Tg.	9
<i>Candida mesenterica</i> .	70 (1), 74 (1), 80 (2), 85 (1) Tg.	5	32—37 Tg.	10
<i>Zygosaccharomyces major</i>	71 (1), 73 (1), 77 (1), 82 (1) Tg.	4	32—37 Tg.	9
<i>Torulopsis jamata</i> . .	72 Tg.	1	32—38 Tg.	10
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	72 (1), 75 (1), 77 (1), 82 (1), 85 (1) Tg.	5	32—37 Tg.	10
Sterile F ₁ -Larven ²				
Kontrolle	alle eingegangen	0	32—36 Tg.	10

Entwicklungsdauer in Tagen von frisch geschlüpften Larven bis zur Metamorphose.

In jede Diät aus Grieß und Weizenmehl wurden 30 Larven eingesetzt, aus Grieß, Weizenmehl und Hefeextrakt 10.

* 50% der Imagines geschlüpft bis zum ... Tage.

¹ welche in getrocknetem Zustand bei der Aufzucht der Parentalgeneration verwendet wurde.

² deren Eltern aus sterilisierten Eiern schlüpften und in Grieß, Weizenmehl und Hefeextrakt zu Imagines heranwuchsen.

Larven der Parentalgeneration zugegeben wurden: *Candida mesenterica*, *Endomyces magnusii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, *Torulopsis albida*, *Torulopsis famata* und *Zygosaccharomyces major*.

Nach Zugabe getrockneter *T. utilis* zum Futter der Parentallarven entwickelten sich aber *alle* Larven der sterilen F_1 -Generation auf Grieß und Weizenmehl zu Imagines, ausgenommen wenige Prozent, die, wie auch bei normalen Larven, durch mechanische Verletzung bei der Übertragung starben.

In jedem Fall waren die Entwicklungszeiten der F_1 -Larven länger als normal. Die larvale Entwicklungsdauer der Imagines, von denen diese Larven stammten, scheint keine Rolle für die F_1 -Generation zu spielen.

Eine ähnliche Erfahrung hatte SCHNEIDER (1956) mit dem Kornkäfer *Calandra oryzae* gemacht. Die symbiontischen Bakterien erzeugen ein wachstumsförderndes Agens, das auch im Milokorn und Weizen enthalten ist, den anderen Getreidearten aber fehlt. Die Nachkommen steriler *Calandra oryzae*, die auf Milokorn gehalten wurden, entwickeln sich normal in geschältem Hafer, und erst die F_2 -Generation geht bei Weiterzucht in Hafer dann im frühen Larvenstadium zugrunde. Anscheinend werden die hochaktiven Wirkstoffe der Symbionten im Körper des Tieres gespeichert und auch in den Eiern deponiert.

b) *Beobachtungen an F_1 -Imagines*. Tabelle 7 zeigt die Lebensdauer der F_1 -Imagines auf Grieß und Weizenmehl, wie auch auf Grieß, Weizenmehl und Hefeextrakt. In beiden Diäten betrug die Lebensdauer aller

Tabelle 7. Lebensdauer der F_1 -Imagines

Hefe ¹	Grieß und Weizenmehl	Grieß, Weizenmehl, Hefeextrakt
<i>Torulopsis famata</i>	—	2 Tg.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6 (1), 8 (1) Tg.	6 (1), 9 (1) Tg.
<i>Candida mesenterica</i>	6 (1), 8 (1), 9 (1)	7 (1), 8 (1) Tg.
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	6 (1), 9 (1), 11 (1) Tg.	7 (1), 10 (1) Tg.
<i>Endomyces magnusii</i>	7 (1), 10 (1) Tg.	7 (1) Tg.
<i>Zygosaccharomyces major</i>	7 (1), 11 (1) Tg.	7 (1), 9 (1) Tg.
<i>Torulopsis albida</i>	7 (1), 12 (2) Tg.	6 (1), 10 (1)
<i>Torulopsis utilis</i>	12—18 Tg. 16,2*	12—19 Tg. 16,8*

Die Zahlen ohne Klammern drücken die Lebensdauer der Imagines in Tagen aus. Die Zahl der Imagines steht in Klammern.

* 50% der Imagines gestorben bis zum ... Tage.

¹ welche in getrocknetem Zustand bei der Aufzucht der Parentalgeneration verwendet wurde.

F_1 -Imagines, deren Parentallarven sich in Testdiät I (Grieß und Weizenmehl) mit Zugabe folgender getrockneter Hefen entwickelten, 6—12 Tage: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, *Candida mesenterica*, *Endomyces magnusii*, *Torulopsis albida* und *Zygosaccharomyces major*.

Von der F_1 -Generation, deren Parentallarven in Testdiät I mit getrockneter *Torulopsis jamata* heranwuchsen, entwickelte sich lediglich eine Larve zu einer männlichen Imago. Dieser Käfer starb nach 2 Tagen, obwohl er auf Grieß, Weizenmehl und Hefeextrakt übertragen wurde.

Überraschend unterschied sich dagegen die Lebensdauer der sterilen F_1 -Imagines, deren Parentallarven in Testdiät I mit getrockneter *T. utilis* wuchsen und sich als Larven mit dieser Hefe infiziert hatten, nicht von der Lebensdauer normaler *Stegobium*-Imagines.

Alle weiblichen F_1 -Imagines legten Eier ab. Die aus diesen Eiern geschlüpften Larven starben in Grieß und Weizenmehl bereits vor der ersten Häutung. In Grieß, Weizenmehl und Hefeextrakt entwickelten sie sich vollkommen normal zu Imagines. Die Vitalität der Tiere wurde also durch die vorangegangenen Versuche nicht beeinträchtigt.

D. Histologische Untersuchungen an Tieren, die mit *Torulopsis utilis* infiziert wurden

I. Frisch infizierte Tiere

1. Larven. Das histologische Bild der mit *Torulopsis utilis* infizierten Larven unterscheidet sich in verschiedener Hinsicht von dem normaler Larven. Normale Larven, wie auch Imagines, von *Stegobium* (*Sitodrepa*) *paniceum* L. wurden bereits 1921 von P. BUCHNER und 1928 von seinem Schüler BREITSPRECHER eingehend untersucht. Letzterer beschreibt die Symbionten nach Ausstrichen der Mitteldarmblindsäcke als ovale, birnenförmige Hefen, die eine Länge von 5μ und eine Breite von $3-3,5\mu$ erreichen (Abb. 1a). Jede Hefezelle enthält eine Vakuole, die stets in der Nähe des abgerundeten Zellendes liegt.

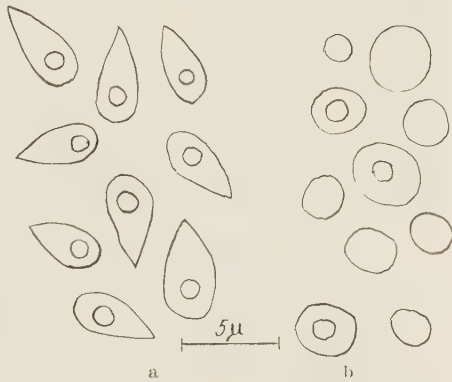


Abb. 1. a *Stegobium paniceum* L. Normale Symbionten aus dem Ausstrich der Blindsäcke. b *Torulopsis utilis* aus dem Ausstrich der Blindsäcke einer mit dieser Hefe infizierten Larve

Schon BUCHNER (1921) macht auf die 2 Zellsorten aufmerksam, welche die Blindsäcke einer *Stegobium*-Larve aufbauen: die einen sind schlanke, etwa 8μ breite und 30μ hohe typische Darmepithelzellen mit ovalen Kernen und Bürstenbesatz. Ihr Plasma enthält Sekretkörnchen. Ein Zeichen dafür, daß sie den übrigen Mitteldarmzellen funktionell gleichwertig sind (Abb. 2a).

Die Zellen der zweiten Art, die Mycetocyten, sind beträchtlich größer als die hefefreien Zellen (Abb. 2a); sie sind meist nahezu quadratisch, und messen im Durchschnitt 35μ in der Höhe und 35μ in der Breite. Sie lassen im Gegensatz zu den hefefreien Zellen keinen Bürstenbesatz erkennen (Abb. 2a). BREITSPRECHER ist der Meinung, daß den Mycetocyten infolge des Fehlens des Bürstenbesatzes die Fähigkeit der Sekretion verlorengegangen ist. Über den Kern der Mycetocyten schreibt er: „Im Gegensatz zu den stets gerundeten Kernen der hefefreien Zellen ist er sehr vielgestaltig und besitzt eine vielfach tief eingebuchtete Oberfläche.“

Diese beiden Zellarten des Blindsackepithels sitzen auf einer dünnen Basalmembran. Zwischen Epithel und Basalmembran liegen hie und da die Kryptenzellen, die für die Regeneration des Darmepithels verantwortlich sind (Abb. 2a).

Ergänzend zu dem von BUCHNER und BREITSPRECHER Mitgeteilten sei erwähnt, daß das Epithel an der Übergangsstelle von den Blindsäcken zum Mitteldarm aus relativ niederen Zellen von 19μ Breite und 14μ Höhe besteht. Sie sind — wie das nach hinten anschließende Mitteldarmepithel (Abb. 2d) — stets symbiontenfrei (Abb. 2b).

Ein etwas anderes Bild bieten die Epithelzellen des Mitteldarms. Sie sind nicht an allen Stellen gleich groß. Im vorderen Drittel des Mitteldarms lassen sich Zellgruppen beobachten, die mehr als die doppelte Höhe der normalen Darmzellen haben. Zwischen diesen Zellgruppen liegen fast quadratische Zellen, durch die auch der mittlere und hintere Teil des Mitteldarmepithels gekennzeichnet ist. Auf einem Längsschnitt bildet so die innere Begrenzung des Mitteldarmepithels eine vorn beginnende und hinten in einer Geraden auslaufende Wellenlinie (Abb. 2d). Den Größenunterschied der einzelnen Zellgruppen zeigen folgende Meßergebnisse: die in das Darmlumen hineinragenden Zellgruppen werden von 4—10 Einzelzellen gebildet, deren mittlere bis zu 56μ hoch ist. Der Durchmesser dieser Zellen beträgt etwa 9μ und die runden bis ovalen 8μ großen Kerne liegen im unteren Zelldrittel. Die in dieser Zellgruppe der höchsten Zelle jederseits anliegenden Nachbarzellen vermindern ihre Höhe kontinuierlich bis sie die Größe der Zellen der zweiten Gruppe erreichen. Diese sind wie oben angegeben, fast quadratisch und messen im Durchschnitt $22 \times 22\mu$. Da die Zellen an Breite zugenommen haben, sind die basal liegenden Kerne meist rund; in ihrer Größe haben sie sich nicht verändert. Die eben beschriebene Gruppe, auf die wieder eine Anzahl hoher, schlanker Zellen folgt, besteht meist aus 2—5 Zellen. Im mittleren Drittel des Mitteldarmepithels lassen sich nur noch die beschriebenen flachen Zellen beobachten, von denen sich die des hinteren Drittels darin unterscheiden, daß sie nur noch etwa halb so groß sind als $12 \times 12\mu$. Der runde Kern liegt in der Mitte der Zelle und hat einen Durchmesser von etwa 5μ .

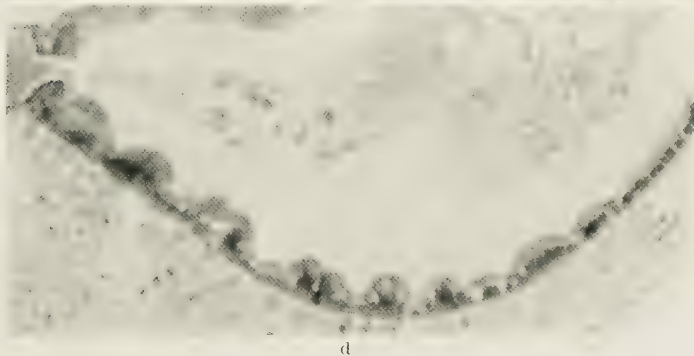
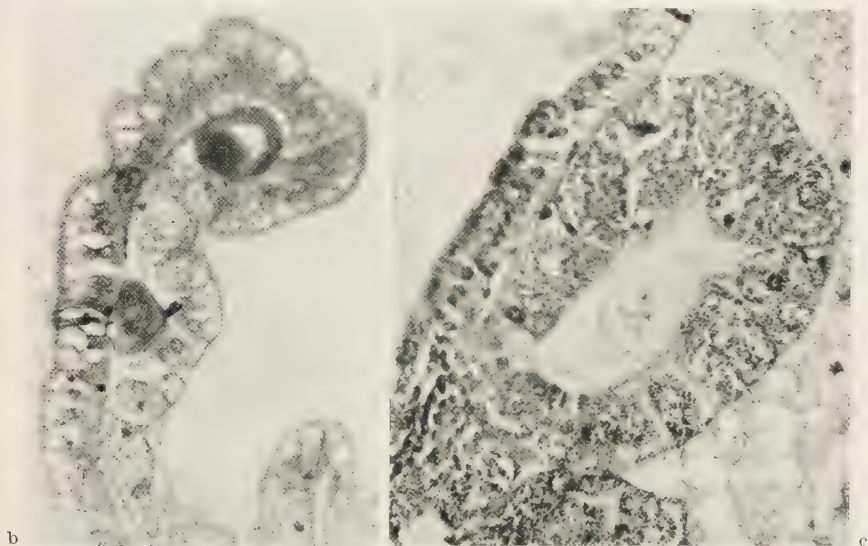
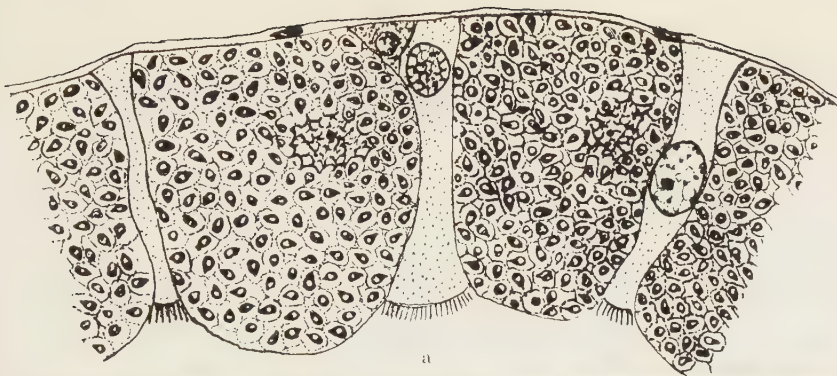


Abb. 2. a Ausschnitt aus dem Blindsackepithel einer normal infizierten *Stegobium*-Larve (nach BREITSPRECHER). b Längsschnitt durch die Region des Übergangs vom Mitteldarm zum Blindsack einer normal infizierten *Stegobium*-Larve (Vergr. etwa $440\times$). c Längsschnitt durch den Mitteldarm und den Blindsack einer normal infizierten *Stegobium*-Larve (Vergr. etwa $300\times$). d Längsschnitt durch den Mitteldarm einer normal infizierten *Stegobium*-Larve (Vergr. etwa $210\times$)

Alle diese Mitteldarmzellen enthalten Sekretkörnern und tragen auf der dem Lumen zugewandten Seite einen Bürstenbesatz. Sie sitzen auf einer dünnen Basalmembran. Zwischen ihr und dem Epithel sind ab und zu Nester von Kryptenzellen eingeschaltet.

Diese zusätzlichen Angaben erschienen mir zum Verständnis des Folgenden wichtig.

Der Darmtrakt von *Stegobium*-Larven, die mit getrockneter *Torulopsis utilis* infiziert wurden, sieht in frisch präpariertem Zustand jenem normal infizierter Tiere durchaus ähnlich. In den Ausstrichen der Blindsackregion sind die Hefezellen deutlich zu erkennen. Sie sind kugelförmig und haben einen Durchmesser von $1,8-3,5\mu$. Sprossung konnte nur selten beobachtet werden, Vakuolen sind oft vorhanden (Abb. 1b).

Eine Überraschung aber brachten die Schnittserien durch die Blindsackregion und die anschließenden Mitteldarmpartien. Es zeigte sich nämlich, daß

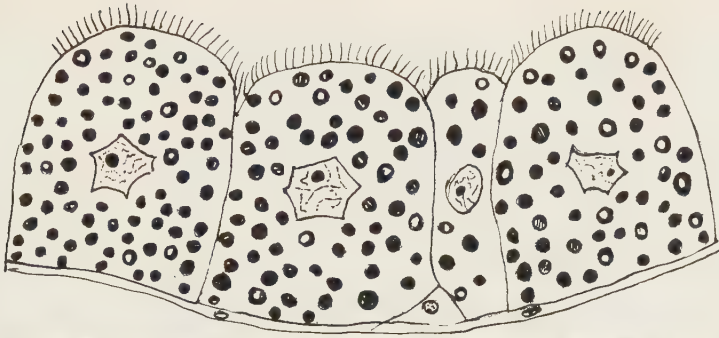
1. alle Mycetocyten des Blindsackepithels mit der Fremdhefe infiziert sind (Abb. 3, 4b, 5b). Allerdings ist die Besiedelungsdichte geringer als in den Mycetocyten normaler Larven. Sie erreichen daher auch nicht ganz deren Größe und messen im Durchschnitt $25 \times 25\mu$. Die Einbuchtungen der Kerne normaler Mycetocyten sind hier zwar vorhanden, aber nicht so stark ausgeprägt.

2. Abgesehen von wenigen Ausnahmen sind auch die schlanken Blindsackepithelzellen mit Stäbchensaum von *T. utilis* besiedelt (Abb. 3a und 5b). Auch sie sind etwas kleiner als die normaler Larven und messen im Durchschnitt $8 \times 25\mu$.

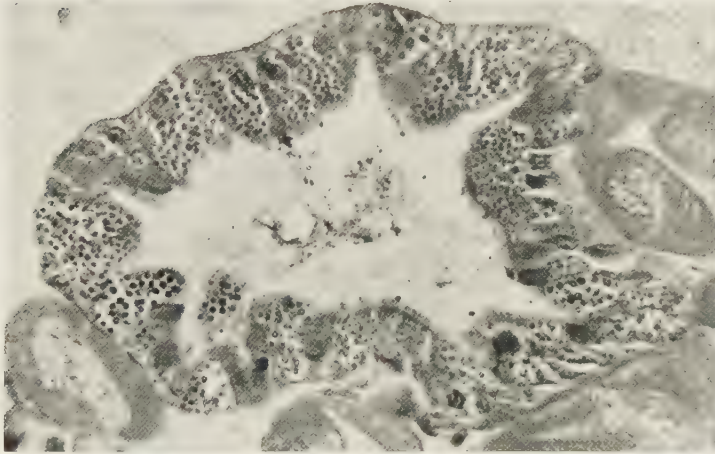
3. Besonders interessant ist, daß nicht nur die jetzt auch von Hefen besiedelten, in normalen Tieren symbiontenfreien Epithelzellen einen Bürstenbesatz besitzen, sondern auch die Mycetocyten (Abb. 3a und 5b). Diese Beobachtung konnte bisher nur bei sterilen Tieren gemacht werden. Aus der Tatsache, daß die sterilen oder mit *T. utilis* besiedelten Mycetocyten einen Bürstenbesatz tragen, auf eine Wiedergewinnung der sekretorischen Funktion dieser Zellen zu schließen, wäre verfrüht.

4. Während bei der Infektion mit arteigenen Hefesymbionten niemals die natürliche Schranke überschritten wird, die zwischen Blindsackepithel und Mitteldarmzellen besteht, fällt diese Schranke in dem Moment, wo die artfremden Gäste vom Wirt aufgenommen werden. Alle Zellen des Mitteldarms einschließlich der Übergangszone vom Blindsackepithel sind jetzt stark mit *T. utilis* infiziert (Abb. 4, 5b). Form und Größe der Zellen entsprechen durchaus den normalen Verhältnissen und auch der Bürstenbesatz bleibt trotz der starken Invasion fremder Hefen unverändert erhalten.

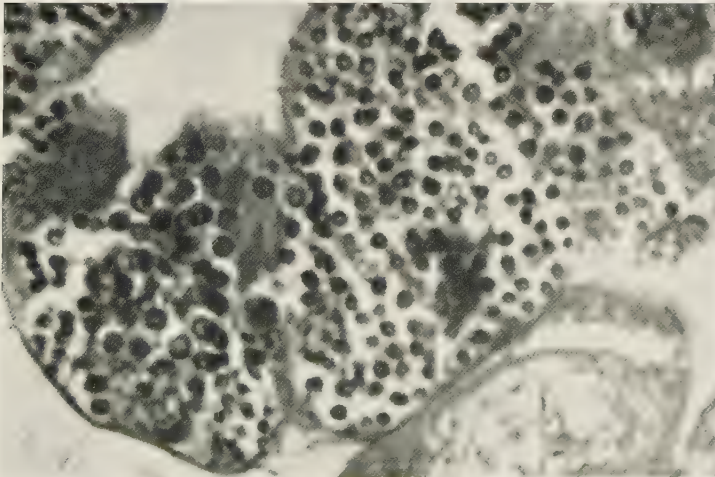
Während der Metamorphose wird der ganze Darmkanal mit sämtlichen Blindsäcken von den Kryptenzellnestern aus vollständig neu



a

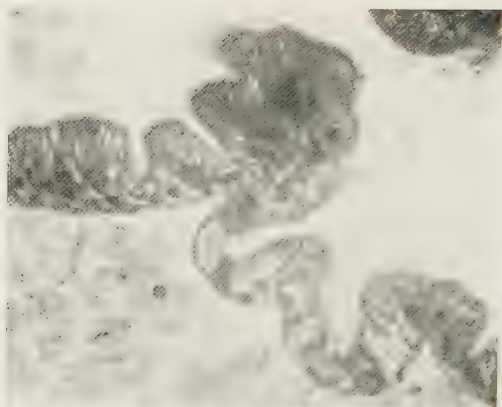


b

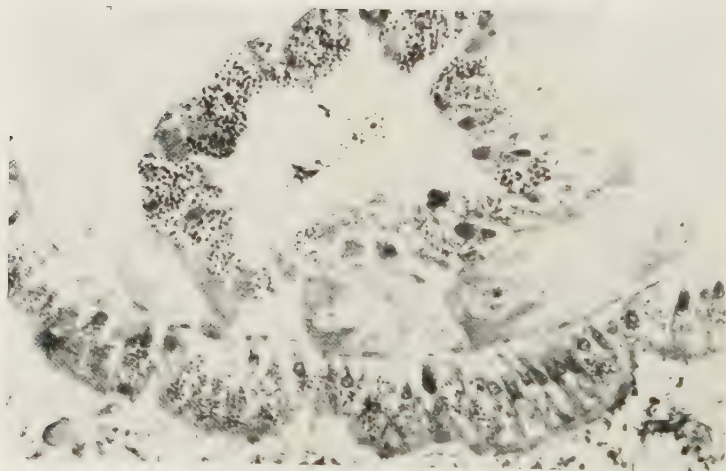


c

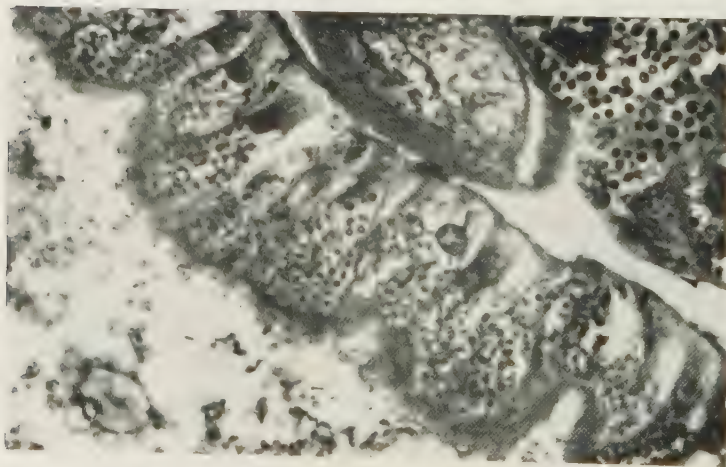
Abb. 3. a Ausschnitt aus dem Blindsackepithel einer mit *Torulopsis utilis* infizierten Larve.
b und c Längsschnitt durch den Blindsack einer mit *Torulopsis utilis* infizierten Larve.
(b Vergr. etwa 400 $\times$; c Vergr. etwa 1000 $\times$)



a



b



c

gebildet; das alte Epithel wird im Lumen des neugebildeten Darms resorbiert. BREITSPRECHER schreibt: „Schon zu einer Zeit, wenn die alte Larve die Nahrungsaufnahme und die Bewegungen einstellt und sich mehr in die Länge streckt, setzt ein massenhaftes Auswandern von Hefen und auch ganzen Mycetocyten aus dem Blindsackepithel ins Darmlumen ein.“ „Mit der letzten Defäkation werden diese Bestandteile aus dem Körper entfernt, ohne daß eine Verdauung der Hefen erfolgt.“ Nach Entstehung des neuen Epithels findet eine Reinfektion der Mycetocyten der Blindsäcke statt. BREITSPRECHER schreibt weiter: „Aus den im larvalen Epithel noch vorhandenen Mycetocyten treten einzelne Hefen in die dahinterliegenden Zellen des imaginalen Darmes über, jede den Anlaß zur Entwicklung einer Mycetocyte gebend, wie sie uns später bei der ausgebildeten Imago entgegentritt. Bald nach dem Übertritt beginnen nämlich die Symbionten sich sehr rasch und ausgiebig zu vermehren, so daß die infizierte Zelle schon in kurzer Zeit völlig mit ihnen gefüllt erscheint.“ Die weitere Infektion „kann entweder durch einen Übertritt vereinzelter Hefepilze aus jungen Mycetocyten in benachbarte pilzfreie Zellen oder durch Aufnahme aus dem Darmlumen vor sich gehen“. „So finden sich im Epithel der neugebildeten Blindsäcke einer jungen Puppe wieder die zwei geschilderten Zellsorten: Mycetocyten und pilzfreie Zellen.“

Während der Metamorphose der mit getrockneter *T. utilis* gefütterten Tiere wandern sowohl die Hefen und ganze Mycetocyten aus dem Blindsackepithel, als auch die Hefen der Mitteldarmepithelzellen ins Darmlumen aus. Auffallend ist aber, daß die Reinfektion des neugebildeten Blindsack- sowie des Mitteldarmepithels unterbleibt. Die neugebildeten Zellen der Blindsäcke der Puppe sind klein und steril. Eine Unterscheidung der für die larvalen Blindsäcke typischen 2 Zellarten ist nicht mehr möglich. Alle diese Zellen haben, wie im früheren larvalen Stadium, einen Bürstenbesatz.

Die neugebildeten Epithelzellen des Mitteldarms der Versuchstiere sind jetzt im histologischen Bild denen der normalen Puppen völlig gleich.

2. Imagines. Die neu entstandenen Blindsäcke des Darms der normalen Imago sind nicht mehr so voluminös wie bei der Larve, und sind tiefer untergeteilt (Abb. 6a). Schon die starke Aufgliederung in einzelne Säckchen kommt im histologischen Bild dadurch zum Ausdruck, daß die dicht mit Hefen gefüllten Mycetocyten äußerst schlank und auch kleiner als die entsprechenden Elemente der larvalen Blindsäcke sind.

Abb. 4. a Längsschnitt durch die Region des Übergangs vom Mitteldarm zum Blindsack einer mit *Torulopsis utilis* infizierten *Stegobium*-Larve (Vergr. etwa 380 ×). b und c Längsschnitt durch den Mitteldarm und den Blindsack einer mit *Torulopsis utilis* infizierten *Stegobium*-Larve. Sämtliche Epithelzellen sind mit Hefen infiziert (b Vergr. etwa 270 ×, c Vergr. etwa 600 ×)

Bei den Imagines, deren Larven mit *T. utilis* infiziert waren, läßt sich demgegenüber ein großer Unterschied feststellen. Auch hier sind



Abb. 5a u. b. Längsschnitt durch den Mitteldarm und einen Blindsack a einer normal infizierten *Stegobium*-Larve. Die schlanken Epithelzellen des Blindsacks und die Mitteldarmepithelzellen sind hefefrei und tragen einen Bürstenbesatz. Die mit Symbionten gefüllten Mycetocyten haben keinen Bürstenbesatz. b einer mit *Torulopsis utilis* infizierten *Stegobium*-Larve. Sämtliche Epithelzellen des Blindsacks und des Mitteldarms sind mit Hefen infiziert und tragen einen Bürstenbesatz (Halbschematisch)

die Blindsäcke noch gut zu erkennen, aber sie haben nicht die Größe wie bei normalen Tieren und sind zart und durchsichtig (Abb. 6b).

In histologischen Schnitten sieht man nur noch sterile Zellen. Wie im neugebildeten Epithel der sterilen Puppe ist es hier nicht möglich, die zwei charakteristischen Zellarten der Blindsäcke zu unterscheiden.

In der alten, normalen Puppe, deren Chitinkutikula sich schon gebräunt hat, treten gewöhnlich viele Symbionten aus dem Blindsack-



Abb. 6. a Darmtrakt einer normal infizierten *Stegobium*-Imago nach dem Leben (Vergr. etwa 60 $\times$). b Darmtrakt einer als Larve mit *Torulopsis utilis* infizierten *Stegobium*-Imago (Vergr. etwa 60 $\times$)

epithel ins Darmlumen über. Bei der ersten Defäkation der jungen Imago gelangen dann diese Hefen in die mit dem Legeapparat in Verbindung stehenden Beschmiereinrichtungen (Intersegmentalschläuche, Vaginaltaschen (s. BREITSPRECHER 1928, S. 506, Abb. 3). In dem Sekret dieser Taschen und Schläuche vermehren sich die Symbionten rasch und bilden so für die Eiinfektion den nötigen Vorrat.

Begreiflicherweise muß bei Tieren aus den Infektionsversuchen mit *T. utilis* nach dem Vorangegangenen eine Infektion der Beschmiereinrichtungen unterbleiben. Schnittpräparate brachten auch hierfür die Bestätigung. Sowohl die Vaginaltaschen, als auch die Intersegmentalschläuche erwiesen sich als leer und wiederholte negative Kulturversuche erbrachten auch auf dem anderen Weg hierfür die Bestätigung.

II. Die F_1 -Generation

1. Larven. Histologische Schnitte durch Larven der F_1 -Generation, die im frischen Grieß und Weizenmehl ohne Zusatz von getrockneter *T. utilis* aufwuchsen, ergaben nur sterile Blindsäcke und Därme. Alle Kulturversuche blieben negativ.

Eine andere Beobachtung aber konnte bei einigen Larven gemacht werden, die sich in der gleichen Testdiät IV, in der auch vorher die

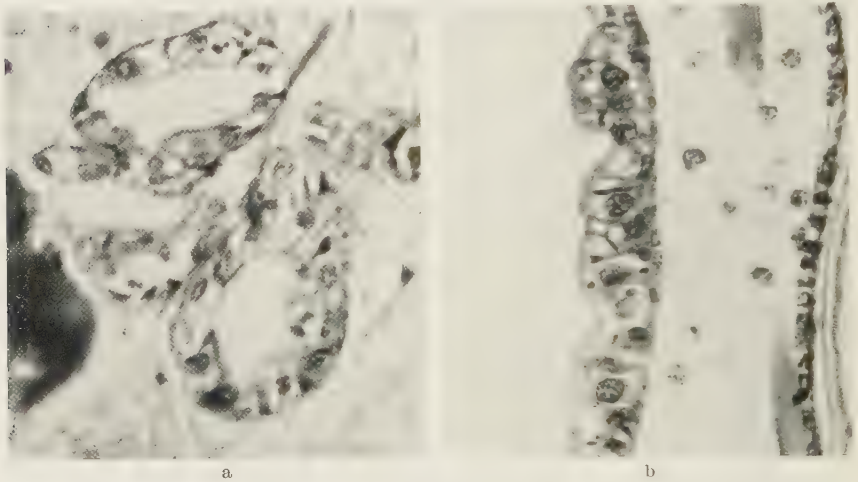


Abb. 7a u. b. Längsschnitt durch eine *Stegobium*-Larve der F_1 -Generation, welche in derselben Testdiät IV (Grieß und Weizenmehl ohne Zusatz) heranwuchs, worin sich die mit *Torulopsis utilis* infizierte Eltern-Generation entwickelte. a Blindsäcke: Eine Mycetocyte mit *Torulopsis utilis* infiziert (Vergr. etwa 600 $\times$). b Mitteldarm: Einige Epithelzellen mit *Torulopsis utilis* infiziert (Vergr. etwa 600 $\times$)

Parentalgeneration gezüchtet wurde, entwickelten. Hier zeigte etwa $\frac{1}{4}$ der untersuchten Tiere eine sehr geringe Infektion mit *T. utilis*. Hier und da waren in einer Mycetocyte oder Darmepithelzelle Gruppen von 2—5 Hefezellen zu beobachten (Abb. 7a, b). Einige der vielfach wiederholten Kulturversuche zerzupfter Blindsäcke und Därme solcher Larven gaben dann auch positive Ergebnisse. Es mußte also das aus einem Gemisch von Weizenmehl und Grieß bestehende Futter durch die darin aufgezogenen Tiere der Parentalgeneration mit Hefekeimen verunreinigt worden sein. Eine Bestätigung dafür brachten Kulturversuche, in denen kleine Proben aus diesen Diäten verimpft wurden. Ungefähr 20% dieser Kulturen ergaben positive Resultate: Wachstum von *T. utilis*. PANT u. FRAENKEL berichteten 1954 ähnliches. Einige sterile *Stegobium*-Larven, die in mit normalen *S. paniceum*-Fäzes gemischtes Weizenmehl kamen, wurden wieder mit den normalen Symbionten infiziert. Eigene Erfahrung (Teil C, II, 3) bestätigte die Angabe.

Die *T. utilis* infiziert, in nur geringen Mengen geboten, nur wenige Zellen der F₁-Larven. Um eine vollkommene Infektion zu erreichen, müssen genügend viele Hefezellen im Futter vorhanden sein, wie z. B. in der Testdiät I, die 10% getrocknete *T. utilis* enthält.

2. Imagines. Alle histologisch untersuchten Blindsäcke und Därme der F₁-Imagines waren vollkommen steril. Auch wiederholte Kulturversuche mit dem Inhalt zerzupfter Säcke blieben negativ. Wie schon erwähnt, legten die F₁-Weibchen Eier ab; die daraus geschlüpften Larven starben jedoch vor der ersten Häutung, wie ja nach den bisherigen Erfahrungen nicht anders zu erwarten war.

E. Bestimmung des relativen Vitamingehaltes des Futters und der Hefen

I. Der *Tribolium*-Test

Testobjekt war der Reismehlkäfer, *Tribolium confusum* Duv. Die Larven dieses Käfers entwickeln sich zur Puppe nur dann, wenn die Nahrung ein Sterin und folgende 8 B-Vitamine enthält: β -Biotin, Pantothensäure, Thiamin (B₁), Riboflavin (B₂), Pyridoxin (B₆), Nicotinsäureamid, Folsäure und Cholinchlorid. Ist eine dieser Komponenten nur unzureichend vorhanden oder fällt sie aus, so reagieren die Larven, welche sich normalerweise bei 31,5° C und 70% relativer Hydratur und in optimaler Diät in etwa 20 Tagen verpuppen, mit einer Verzögerung der Entwicklung, bzw. mit völligem Wachstumsstillstand und schließlich mit dem Tod. Um das Imaginalstadium zu erreichen ist noch ein biogenes Amin, Carnitin, der „*Tribolium*-Imago-Faktor“ von FRÖBRICH, in der Diät erforderlich. Nähere Angaben s. die Mitteilungen von FRÖBRICH (1953a, b), FRÖBRICH u. OFFHAUS (1953) und SCHWARZ u. KOCH (1954).

II. Technik

Alle getesteten Hefen wurden 4 Wochen lang in je 1 Liter flüssigen Nährboden im Temperaturschrank bei 30° C und 70% Luftfeuchtigkeit gezüchtet. Für die Kultivierung kamen 2 Medien in Frage: Bierwürze ohne Zusatz und Nutrient Growth (Difco) mit Zusatz von 2% Glucose. Nach Trennung der Hefen vom Nährsubstrat folgte eine Reinigung der Hefen durch mehrmaliges Waschen mit Leitungswasser, Dekantieren und Abzentrifugieren. Vergleichsweise wurden auch beimpfte und unbeimpfte Nährböden auf ihren Gehalt an B-Vitaminen geprüft. Nur so konnte festgestellt werden, ob von den kultivierten Hefen dem Nährsubstrat Vitamine entzogen oder neu zugefügt werden.

Hefen, beimpfte und unbeimpfte Nährböden wurden im Trockenschrank bei 40° C vorsichtig getrocknet. Die so gewonnene Trockensubstanz wurde fein zermahlen und dann in einem bestimmten Mengenverhältnis den synthetischen Testdiäten zugesetzt. Um feinere quanti-

tative Unterschiede im Vitamingehalt der zu prüfenden Substanzen zu erfassen, müssen vitaminreiche Proben *geringer* dosiert werden als relativ vitaminarme (vgl. die Resultate für *Torulopsis utilis* in Tabelle 9 und 11!). So wurden z. B. pro 1 g Diät nur 10 mg Hefe bzw. Hefeextrakt zugesetzt; von der Nährbodensubstanz dagegen mußte die 5fache Menge genommen werden, um überhaupt noch faßbare Resultate zu erzielen. Dies ist beim Studium der Tabellen besonders zu beachten! Das gleiche gilt auch für die Testung der normalen Nahrung von *Stegobium paniceum*, Grieß und Weizenmehl, die auch mit 50 mg pro 1 g Diät getestet wurde.

Wenn *Torulopsis utilis* außerdem auch noch in höherer Dosierung getestet wurde (50 mg für 1 g Diät), so nur deshalb, um genaue Vergleiche mit den Resultaten GRAEBNERS¹ (1954) zu erzielen, der damals noch mit dieser relativ hohen Dosierung den Vitamingehalt verschiedener symbiontischer Hefen, so auch der *Stegobium*-Symbionten untersucht hat (Tabelle 9).

Fräulein Dr. I. SCHWARZ führte in dankenswerter Weise die Testversuche der einzelnen Objekte unter Assistenz des Autors durch. Bei der Auswertung der Protokolle wurde das von KOCH (1955) angegebene Zeichensystem angewandt, dessen Erklärung unter den Vitamintabellen erscheint.

III. Ergebnisse

1. Vitamingehalt des Futters und des Hefeextraktes. Der *Tribolium*-Test ergibt (Tabelle 8), daß Grieß und Weizenmehl β -Biotin, Thiamin, Pyridoxin, Folsäure und Cholinchlorid enthalten, daß aber Pantothen-säure, Riboflavin und Nicotinsäure entweder fehlen oder nur in Spuren

Tabelle 8. Vitamingehalt der Normaldiät (Grieß und Weizenmehl) und des Hefeextraktes

Material	β - Bio- tin	Panto- then- säure	Thiamin (B ₁)	Ribo- flavin (B ₂)	Pyrid- oxin (B ₆)	Nicotin- säure	Fol- säure	Cholin- chlorid	Carni- tin
Steinmetz Vital-Grieß (50mg/g Diät)	×	0	× × ×	0	× ×	0	×	× × ×	+
Tivoli Weizen- mehl Type 812 (50mg/g Diät)	×	0	× × × ×	0	× ×	0	× ×	× × × ×	+
Zyma-Hefe- extrakt (10mg/g Diät)	×	× × ×	0	× × ×	× × ×	× × × ×	× ×	× × ×	+

Zeichenerklärung (nach KOCH 1955): × × × × 13—21 Tage*, × × × × 17 bis 28 Tage, × × × 20—30 Tage, × × 23—35 Tage, × 25—47 Tage, 0 über 50 Tage ungenügend, + vorhanden, — nicht vorhanden.

* Von frisch geschlüpfter Larve bis zur Puppe.

¹ Siehe KOCH 1955, Tabelle 1, S. 336.

vorhanden sind; Carnitin ist vorhanden. Zyma-Hefeextrakt dagegen enthält alle B-Vitamine ausreichend außer Thiamin, und auch Carnitin ist darin vorhanden. Gerade hier spielt das Mengenverhältnis der zu testenden Substanzen zur Grunddiät eine recht bedeutsame Rolle. In den Testen mit Hefeextrakt kam nur $\frac{1}{5}$ soviel Substrat (10 mg) zur Mangeldiät wie in den Diäten mit Grieß und Weizenmehl (50 mg). Die Entwicklungszeit normal infizierter *Stegobium*-Larven beträgt in Grieß und Weizenmehl 50—55 Tage. Durch Zusatz von 10% Hefeextrakt zu dieser Nahrung wird aber die Entwicklungszeit erheblich verkürzt auf 32—37 Tage. Sterile Larven haben in Diäten mit Hefeextrakt dieselbe Entwicklungszeit wie infizierte. Dies ist ein Zeichen dafür, daß der Hefeextrakt, dem nur Thiamin fehlt, in idealer Weise die in Grieß und Weizenmehl mangelnden Vitamine ergänzt. Thiamin wird in ausreichender Menge von Grieß und Weizenmehl geliefert.

2. Vitamingehalt der Hefen und der Nährböden. Die Tabellen 10 und 11 zeigen sowohl den Vitamingehalt der getesteten Hefen als auch den der Nährböden vor und nach der Beimpfung. Man ersieht daraus, daß die Hefen dem Substrat manche Wachstoffsstoffe entziehen, andere wieder an das Substrat abgeben. Unbeimpfte Bierwürze enthält nach meinen Testergebnissen folgende Vitamine: β -Biotin, Pyridoxin, Nicotinsäure und Cholinchlorid; nicht nachzuweisen waren: Pantothersäure, Thiamin, Riboflavin und Folsäure. Unbeimpfte Nutrient Broth ist dagegen um ein B-Vitamin reicher, nämlich Pantothersäure. Carnitin ist in beiden Nährböden vorhanden.

Aus den Tabelle 10 und 11 kann abgelesen werden, welche Vitamine die Hefen enthalten, und welche sie während des Wachstums an die Nährböden sowohl abgeben als auch ihnen entziehen. *Torulopsis utilis* (Tabelle 9 und 11), die einzige der getesteten Hefen, welche sterile *Stegobium*-Larven als „Symbionten“ intrazellulär aufgenommen haben, enthält folgende Vitamine: β -Biotin, Pantothersäure, Riboflavin, Pyridoxin, Nicotinsäureamid, Folsäure und Cholinchlorid. Thiamin ist bei 10 mg pro 1 g Diät (Tabelle 11) nicht nachweisbar; bei 50 mg pro 1 g Diät (Tabelle 9) dagegen ist es eben noch feststellbar. Diese Hefe gibt an den Nährboden folgende Vitamine ab: Pantothersäure, Riboflavin, Pyridoxin, Folsäure und Cholinchlorid in guten Mengen und etwas Nicotinsäureamid; der β -Biotinwert bleibt der gleiche wie vor der Beimpfung. Die normalen Symbionten von *S. paniceum* (Tabelle 9) enthalten alle getesteten B-Vitamine. Sie geben aber nur Pantothersäure, Riboflavin und Pyridoxin in guten Mengen an das Nährsubstrat ab und auch ein wenig Thiamin, Folsäure und Cholinchlorid. Nicotinsäure, die im Nährboden vor der Beimpfung vorhanden war, ist nach dem Wachstum der Symbionten nicht mehr darin nachweisbar; die symbiontischen Hefen haben dieses Vitamin dem Nährsubstrat entzogen. Der

Tabelle 9. Vitamingehalt der *Stegobium-Symbionten* und der *Torulopsis utilis*, sowie ihrer Nährmedien vor und nach der Beimpfung

Material *	β -Biotin	Pantothensäure	Thiamin (B ₁)	Riboflavin (B ₂)	Pyridoxin (B ₆)	Nicotinsäure	Folsäure	Cholinchlorid	Carnitin
<i>Stegobium-Symbionten</i>									
Nährboden vor der Beimpfung .	x	x x x x x	x x x	x x x x x	x x x	x x x x x	x x x x x	x x x x	+
Nährboden nach der Beimpfung .	x	0	0	x	x	x x x x	x x x	x	+
<i>Torulopsis utilis</i>									
Nährboden vor der Beimpfung .	x x x x	x x x x x	x	x x x x x	x x x x x	x x x x x	x x x x x	x x x x x	+
Nährboden nach der Beimpfung .	x	x x x x x	0	0	x	x x x x x	0	x x x x x	+
									+

Zeichenerklärung (nach KOCH 1955): x x x x x 13—21 Tage **, x x x x x 17—28 Tage, x x x 20—30 Tage, x x 23 35 Tage, . 25—47 Tage, 0 über 50 Tage ungenügend, + vorhanden, — nicht vorhanden.

Die Werte für die *Stegobium-Symbionten* sind der Arbeit KOCH 1955 entnommen.

* Zu jeder *Tribolium*-Diät kam 50 mg Testsubstanz pro 1 g Diät. ** Von frisch geschlüpfter Larve zur Puppe.

Tabelle 10. Vitamingehalt verschiedener Hefen, welche auf Bierwürze gezüchtet wurden, sowie des Nährmediums vor und nach der Beimpfung

Material *	β -Biotin	Pantothensäure	Thiamin (B ₁)	Riboflavin (B ₂)	Pyridoxin (B ₆)	Nicotinsäure	Folsäure	Cholinchlorid	Carnitin
Bierwürze (Medium vor der Beimpfung)									
<i>Candida reukaufii</i>	x x x	0	0	0	x x x	x x	0	x x x	+
Medium nach der Beimpfung . .	x	0	x	0	x x x x	x x	x x x x	x x x x	+
<i>Hansenula californica</i>	x x x	x x x x	0	x x	x x x x	x x x	x x x	x x x x	+
Medium nach der Beimpfung . .	x	x	0	x	x x x	x x	x	x x x x	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>ellip.</i>	x x x x	0	x x x x	x x	x x	x x	x x x x	x x x x	+
Medium nach der Beimpfung . .	x	x x	x x x x	0	x x x	x x x	x x x x	x x x x	+
Symbionten aus <i>R. bifasciatum</i> .	x x x x	x x	x x x x x	x x x x	x x x x	x x x	x x x x	x x x x	+
Medium nach der Beimpfung . .	x	0	x x	0	x x x	x x	x x x x	x x x x	+
Symbionten aus <i>R. inquisitor</i> . .	x x x	x x x	x x x	x x x	x x x	x x x	x x x x	x x x x	+
Medium nach der Beimpfung . .	x	0	0	x	x x x	x x x	0	x x x x	+
Symbionten aus <i>S. bupres.</i> . . .	x x x	x x x	x x x	x x x	x x x	x	x x x x	x x x x	+
Medium nach der Beimpfung . .	x	0	x x	0	x x x x	x x	x x	x x x x	+

Tabelle 11. Vitamingehalt verschiedener Hefen, welche auf Nutrient Broth gezüchtet wurden, sowie des Nährmediums vor und nach der Beimpfung

Material *	β -Biotin	Pantothen- säure	Thiamin (B ₁)	Riboflavin (B ₂)	Pyridoxin (B ₆)	Nicotin- säure	Folsäure	Cholin- chlorid	Carnitin
Nutrient Broth (Medium vor Beimpfung)	x	x x	0	0	x	x x x	0	x x	+
<i>Candida mesenterica</i>	x	x	0	x x x	x x x	x x x x	x x x	x x	+
Medium nach der Beimpfung	x	x x	0	x x x	x x x x	x x x x	x x x	x	+
<i>Endomyces magnusii</i>	x x	x x x	x x	x x x	x x x	x x x x	x x x x	x x x	+
Medium nach der Beimpfung	x	x x	0	x x	x	x	x x	x x	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Bierhefe)	x	x x x x	x	x x x	x	x x x	x x x x	x x	+
Medium nach der Beimpfung	x x x	x x x x	x	x x x	x x	x x x x	x x x x	x x x	+
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	x x	x x x x	x x	x x x x	x x x	x x x x x	x x x x	x x x	+
Medium nach der Beimpfung	x	x x x x	0	x x	x x x	x x x x	x x x x	x x x	+
<i>Sporobolomyces spec.</i>	x x x x	x x x x x	0	x x x x x	x x x	x x x x	x x x x	x x x x	+
Medium nach der Beimpfung	x x x	x x x x	0	x x x x	x x x	x x x x	x x x x	x x x x	+
<i>Torulopsis albidula</i>	x x x x	x x x x	0	x x x x	x x x x	x x x x	x x x x	x x x x	+
Medium nach der Beimpfung	x	x x x	0	x x x x	x x x x	x x x x	x x x x	x x x x	+
<i>Torulopsis famata</i>	x x	x x x x	0	x x x x	x x x x	x x x x	x x x x	x x x x	+
Medium nach der Beimpfung	x x	x x x x	x	x x x x	x x	x x x x	x x x x	x x x x	+
<i>Torulopsis utilis</i>	x	x x x	0	x x x	x x	x x x x	x x x	x x x	+
Medium nach der Beimpfung	x	x x x x	0	x x x	x	x x x x	x x x	x x x	+
<i>Zygosaccharomyces major</i>	x	x x x	x x	x x x	x x x x	x x x x	x x x x	x x x x	+
Medium nach der Beimpfung	x	x x x x	0	x x x	x x x x	x x x x	x x x x	x x x x	+

Zeichenerklärung (nach KOCH 1955): x x x x x 13—21 Tage**, x x x x x 17—28 Tage, x x x 20—30 Tage, x x 23—35 Tage, x 25—47 Tage, 0 über 50 Tage ungenügend, + vorhanden, — nicht vorhanden.

* Zu jeder *Tribolium*-Diät kam für Hefen 10 mg Testsustanz pro 1 g Diät, für das Kulturmedium 50 mg.

** Von der frisch geschlüpften Larve bis zur Puppe.

Biotingehalt des Nährbodens blieb auch nach Abschluß des Versuches der gleiche.

PANT u. FRAENKEL (1954) haben gezeigt, daß *sterile Stegobium*-Larven in Diäten nicht gedeihen, denen folgende Vitamine fehlen: Thiamin, Riboflavin, Pyridoxin, Nicotinsäure, Pantothersäure, β -Biotin und Folsäure; *normale* Larven dagegen benötigen nur Thiamin zu ihrem Gedeihen und außerdem noch β -Biotin für eine ideale Entwicklung. Tabelle 9 zeigt aber, daß von *Stegobium*-Symbionten alle diese Vitamine, mit Ausnahme von β -Biotin und Nicotinsäure, an das Nährsubstrat abgegeben werden. Daß aber nach dem Wachstum der Symbionten keine Nicotinsäure mehr im Nährboden nachweisbar war, ist kein eindeutiges Zeichen dafür, daß die Hefen dieses Vitamin dem Wirtsorganismus nicht liefern. Daraus kann man nur schließen, daß Nicotinsäure von den Symbionten während des Wachstums *in vitro* aus dem Nährsubstrat aufgenommen wird. Auch *Torulopsis utilis* gibt in ausreichenden Mengen alle die von PANT u. FRAENKEL für sterile Larven notwendig befundenen Vitamine an das Nährsubstrat, außer Thiamin und β -Biotin. Der einzige auffallende Unterschied zwischen dem physiologischen Verhalten der *Stegobium*-Symbionten und *T. utilis* ist der restlose Entzug der Nicotinsäure aus dem Nährmedium, wie ihn GRAEBNER bei den *Stegobium*-Symbionten beobachtet hat (vgl. KOCH 1955). Über Vitaminheterotrophie in symbiontischen Hefen wurde erst kürzlich von JURZITZA (1959) berichtet. Die symbiontischen Hefen aus *Leptura rubra* benötigen Thiamin und Biotin, die aus *Rhagium mordax* nur Biotin allein zum Wachstum. Die Hefen aus *R. inquisitor* werden durch Biotin stark gefördert. Aus Tabelle 9 ist zu entnehmen, daß die *Stegobium*-Symbionten Thiamin und Pantothersäure nicht zu ihrem Wachstum benötigen und auch daß *Torulopsis utilis* die im Nährsubstrat fehlenden Vitamine (Thiamin, Riboflavin, Folsäure) selbst zu synthetisieren vermag.

Aus Tabelle 10 kann der Vitamingehalt dreier symbiontischer Hefen abgelesen werden. Alle diese Hefen gehören zu der Gattung *Candida*. Sie wurden von GRAEBNER (1954) aus verschiedenen Vertretern der Cerambycidae isoliert und in Reinkulturen gezüchtet. Die Symbionten von *Rhagium inquisitor* enthalten alle Vitamine in reichlicher Menge. Die Hefen von *Rhagium bifasciatum* stehen ihnen etwas im Pantothersäuregehalt nach, wenn sie auch dieses Vitamin selbst zu synthetisieren vermögen. Dagegen enthalten die Symbionten von *Spondylis buprestoides* geringere Mengen an Pyridoxin und relativ wenig Nicotinsäure.

Tabelle 10 und 11 zeigen den Vitamingehalt der getesteten Hefen.

β -Biotin ist in der Hälfte der Hefen nur in geringer Menge vorhanden; in der anderen Hälfte kommt es in reichlicher Menge vor.

Pantothensäure war nicht nachweisbar in *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, aber sie war im Medium nach dem Wachstum vorhanden¹. In allen anderen Hefen kam sie in reichlicher Menge vor, außer bei den Symbionten von *Rhagium bifasciatum*, *Candida mesenterica* und *Torulopsis utilis*, welche daran relativ arm sind.

Dagegen konnte *Thiamin* in *Hansenula californica*, *Candida mesenterica*, *Sporobolomyces* spec., *Torulopsis albida* und *T. utilis* (bei 10 mg für 1 g Diät) nicht nachgewiesen werden. Es ist in reichlicher Menge in allen anderen Hefen vorhanden, außer in *Endomyces magnusii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pastorianus*, *T. jamata* und *Zygosaccharomyces major*, worin es in recht geringer Menge vorkommt.

Mit Hilfe des *Tribolium*-Testes war *Riboflavin* in allen Hefen nachweisbar; nur in *Hansenula californica*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* und *T. utilis* war es in geringer Menge vorhanden, während es in allen anderen in reichlicher Menge nachweisbar ist. *Pyridoxin* kommt in reichlicher Menge in allen Hefen, mit Ausnahme von *Saccharomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae* var. *ellip.*, Symbionten aus *Spondylis buprestoides*, *Torulopsis jamata* und *T. utilis* vor, in denen es nur in geringer Menge vorhanden ist.

Auch *Nicotinsäure* konnte in allen Hefen nachgewiesen werden; sie war in reichlicher Menge vorhanden in allen getesteten Hefen, außer in *Candida reukaufii*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellip.* und Symbionten aus *Spondylis buprestoides*. Mit einer einzigen Ausnahme ist

Folsäure in reichlicher Menge in allen Hefen vorhanden; nur *T. utilis* enthält nach Wachstum wenig von diesem Vitamin, aber sie gibt es an das Nährsubstrat reichlich ab.

Auch nur mit einer Ausnahme kommt *Cholinchlorid* in allen Hefen reichlich vor; *Candida mesenterica* enthält es in geringer Menge, und sie gibt diesen Stoff auch nicht an das Nährmedium ab. *Carnitin* ist in allen getesteten Hefen vorhanden.

Diese zum Teil beträchtlichen Unterschiede im Vitamingehalt der verschiedenen Hefearten mahnen zur Vorsicht bei Verallgemeinerung von Befunden, die an einer einzigen Art gewonnen wurden. Dies gilt vor allem auch für symbiontische Mikroorganismen.

IV. Beziehungen zwischen Entwicklungsdauer der *Stegobium*-Larven und dem Vitamingehalt des Futters, des Hefeextraktes und der Hefen

Wie der *Tribolium*-Test ergab, sind Pantothensäure, Riboflavin und Nicotinsäure in der in diesen Versuchen benutzten Normaldiät (Grieß

¹ Bei 50 mg Testsubstanz pro 1 g Diät ist die Pantothensäure eben noch nachweisbar; offenbar wird sie in der Zelle nicht in größerer Menge gestapelt, sondern sofort an das Außenmedium abgegeben.

und Weizenmehl) nicht nachweisbar. Für das Wachstum *steriler Stegobium*-Larven sind diese Vitamine unentbehrlich, und sie müssen daher in irgendeiner Weise der Diät zugesetzt werden. Für eine optimale Entwicklungszeit sind dazu noch ausreichende Mengen von β -Biotin, Pyridoxin und Folsäure erforderlich, sie sind — wie die Teste ergaben — nur in geringen Mengen in Grieß und Weizenmehl vorhanden; nur Thiamin und Cholinchlorid sind reichlich darin enthalten (Tabelle 8). Zusatz von 10% Hefeextrakt (Tabelle 8) kann die in Grieß und Weizenmehl fehlenden oder nur in geringen Mengen vorhandenen Vitamine ergänzen; sterile Larven erreichen darin eine optimale Entwicklungszeit von 34,6 Tagen. Die wirtseigenen Symbionten sind aber nicht so leistungsfähig, denn normale Larven, welche in Grieß und Weizenmehl ohne Zusatz von Hefeextrakt aufgezogen wurden, brauchen 52,6 Tage für ihre Entwicklung; bei Zusatz von Hefeextrakt zur Diät dagegen nur 34,4 Tage.

Der Unterschied in der Entwicklungsdauer (36,5 Tage) der künstlich mit *Torulopsis utilis* infizierten Larven, welche in Testdiät I (mit getrockneter *T. utilis*) aufgezogen wurden und solcher infizierter Tiere, welche nach 2 Wochen in Testdiät I in Testdiät IV (Grieß und Weizenmehl ohne Zusatz) übertragen wurden (52,5 Tage), ist ein Zeichen dafür, daß die Beschleunigung der Entwicklung in Testdiät I auf die Wirkung der bei der Verdauung frei werdenden Inhaltsstoffe der getrockneten Hefe zurückzuführen ist. Dagegen haben die Tiere in Testdiät IV (ohne Zusatz) nur den Vitaminschatz ihrer intrazellulären Hefen zur Verfügung.

Die kürzesten Entwicklungszeiten (32—38 Tage) wurden in Diäten mit Zusatz von *Torulopsis albida* und *Sporobolomyces* spec. erreicht, was auf den hohen Anteil von β -Biotin, Pantothersäure, Riboflavin und Nicotinsäure in diesen Hefen zurückzuführen ist (Tabelle 11). Pantothersäure, Riboflavin und Nicotinsäure fehlen aber nach unseren Befunden dem Grieß und Weizenmehl und β -Biotin ist darin nur in sehr geringen Mengen vorhanden (Tabelle 8). Die längste Entwicklungszeit (60—70 Tage) kam in der Diät mit Zusatz von *Candida mesenterica* vor. Diese Hefe enthält nur eine sehr geringe Menge von β -Biotin und Pantothersäure, wenn auch Riboflavin und Nicotinsäure in guten Mengen vorhanden sind (Tabelle 11).

F. Diskussion der Ergebnisse

Vor 27 Jahren stellten KOCH (1933a, b) am Brotkäfer und ASCHNER u. RIES (1933) an der Kleiderlaus die lebenswichtige Bedeutung der Endosymbionten unter Beweis. KOCHS Versuche sind in dieser Arbeit schon beschrieben worden. Seine Ergebnisse an *Stegobium paniceum* harmonisieren bestens mit denen ASCHNERS an *Pediculus vestimenti*. ASCHNER u. RIES (1933) zeigten, daß Symbiontenverlust in der Kleiderlaus, in diesem Fall durch Exstirpation des Mycetoms, schwerste Schäd-

digung (Muskelschwäche, Saugunfähigkeit, Ovogenesestörungen) und schließlich den Tod zur Folge hat. Rektale Injektion von Hefeextrakten verlängert die Lebenszeit der operierten Tiere auf das Doppelte.

Einige Zeit später haben Versuche auch an anderen Tieren die Unentbehrlichkeit der Symbionten bewiesen. Beim Symbiontenverlust wurden in den folgenden Fällen schwere Metamorphosestörungen, Häutungshemmungen und vorzeitiger Tod festgestellt: bei den blutsaugenden Triatomiden (BRECHER u. WIGGLESWORTH 1944, GEIGY, HALFF u. KOCHER 1953, BEWIG u. SCHWARTZ 1956), bei der Wanze *Coptosoma scutellatum* (MÜLLER 1956), und bei Blattiden (FRANK 1954, 1956, BROOKS u. RICHARDS 1955, DE HALLER 1955). Alle diese Ausfallerscheinungen konnten durch rechtzeitige Verabreichung von Vitaminpräparaten oder durch Reinfektion mit den eigenen Symbionten behoben oder wenigstens vermindert werden.

KOCH (1933b) versuchte die Bedeutung der symbiontischen Hefen von *Stegobium paniceum* durch weitere Experimente näher zu ergründen. Er setzte eine Versuchsreihe mit den 3 Vitaminen A, D und B₁ an. Im Parallelversuch wurden dem Futter verschiedene Hefepräparate zugesetzt. Die Versuche, die mit frisch geschlüpften sterilen Larven bei 31,5° C angesetzt wurden, wurden nach 26 bzw. 36 Tagen unterbrochen und die Größe der Larven durch Photographie festgehalten. In völlig vitaminfreier Diät war kaum ein Zuwachs und auch bei Zufütterung von Vitamin B₁, A + D, oder A + B₁ + D war nur eine geringe Größenzunahme zu verzeichnen. Diese Zwerglarven gehen alle früher oder später zugrunde. Nur die Larven mit 10 % Hefefütterung entwickelten sich normal und ergaben schließlich sterile Imagines. KOCH zeigte so, daß für das normale Wachstum der *Stegobium*-Larven die Wachstumsvitamine der Hefe verantwortlich sind, und er vermutete, daß außer den Vitaminen B₁, A und D noch weitere Wachstumsfaktoren der Hefe für die Normalentwicklung nötig sind.

Heute wissen wir, daß diese Faktoren der Hefe folgende 8 B-Vitamine sind: Thiamin, Riboflavin, Pyridoxin, β -Biotin, Pantothersäure, Nicotinsäure, Folsäure und Cholinchlorid; es ist seit längerer Zeit schon bekannt gewesen, daß Hefe und Leber die zwei reichsten Quellen dieser Wachstumsvitamine sind (RUDOLPH 1948).

ALBRITTON (1955) und LIPKE u. FRAENKEL (1956) haben in zusammenfassenden Darstellungen gezeigt, daß zum Wachstum aller Insekten ohne Symbionten Thiamin, Riboflavin, Nicotinsäure, Pyridoxin und Pantothersäure erforderlich sind, und daß viele Insekten dazu noch Folsäure, β -Biotin und Cholinchlorid brauchen. FRAENKEL u. Mitarb. haben weiter in zahlreichen Arbeiten bewiesen, daß Insekten mit Symbionten für ihr Wachstum manche der oben genannten Vitamine

entbehren können; die in den Diäten fehlenden Vitamine werden in diesen Fällen dem Wirtsorganismus von den Symbionten geliefert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Befunde von BLEWETT u. FRAENKEL (1943, 1944); in Diäten ohne Pantothersäure, Riboflavin und Nicotinsäure finden sterile *Stegobium*-Larven frühzeitig den Tod. Alle in meinen Versuchen benutzten Hefen vermögen diesen Vitaminmangel zu beseitigen. Der *Tribolium*-Test zeigt, daß — Thiamin ausgenommen — die erforderlichen B-Vitamine alle in diesen Hefen in größeren und kleineren Mengen entweder vorhanden sind oder in das Nährsubstrat während des Wachstums ausgeschieden werden. Es mag vielleicht überraschen, daß sterile *Imagines* in Grieß und Weizenmehl genauso lang wie normal infizierte Tiere zu leben vermögen, obwohl drei der lebensnotwendigen Wachstumsvitamine darin fehlen bzw. nicht mehr mit unseren Methoden nachweisbar sind. Aber diese Tiere hatten ja im Laufe ihrer langen Larvalentwicklung zweifellos genügend Vitamine in ihrem Fettkörper gestapelt (vgl. KAUDEWITZ 1953, S. 409). Für die relativ kurze Lebensdauer der *Imagines* (9—21 Tage) mag dieser Vitaminvorrat ausreichen. Dafür spricht die noch kürzere Lebensdauer der sterilen F_1 -*Imagines*, deren Parentalgeneration sich in Diäten mit getrockneten Hefen (mit Ausnahme von *T. utilis*!) entwickelten. Die wenigen Larven der F_1 -Generation, die in Grieß und Weizenmehl ohne Zusatz zu *Imagines* heranwuchsen, starben 2—12 Tage nach dem Schlüpfen. Vermutlich reichten die im Eidotter aufgespeicherten Vitamine in diesen Fällen noch aus, um die Metamorphose zu vollenden, aber sie genügen nicht mehr für eine normale Lebensdauer der *Imagines*. REYNOLDS (1945) zeigte, daß die Entwicklungsgeschwindigkeit der Nachkommenschaft bei *Tribolium destructor* durch den Nährwert der Nahrung der Elterngeneration beeinflußt ist. Die larvale Entwicklungszeit ist kürzer, wenn die Elterngeneration auf Mehl von 85% Ausmahlung gezogen wurde, als wenn sie sich auf Mehl von 60% Ausmahlung, das sehr arm an B-Vitaminen ist, entwickelt hat. Die Nahrung der Larven spielt dabei nicht mehr die ausschlaggebende Rolle. Wenn die Elterngeneration in stark ausgemahlenem Mehl (von 85%) sich entwickelt hat, wächst auch die Filialgeneration auf Mehl von geringerem Ausmahlungsgrad (60%) rascher, als wenn umgekehrt die Elterngeneration in 60%-Mehl herangewachsen war und die F_1 -Generation auf Mehl von 85% gezüchtet wurde.

Wir wissen auch heute, daß Insekten nur die Vitamine des B-Komplexes brauchen, und daß die Vitamine A, C, D, E, K und P in ihren Diäten nicht erforderlich sind. Die B-Vitamine aber funktionieren als Komponenten der Enzym-Systeme, die für alle Lebewesen wichtig sind. Die anderen Vitamine spielen hauptsächlich bei Wirbeltieren eine wichtige Rolle in Lebensprozessen, die den Insekten entweder fehlen oder

nicht ähnlich sind: Vitamin A: Schleimhäute; Vitamine C und P: Permeabilität der Blutgefäße; Vitamin D: Knochenbildung; Vitamin E: Keimdrüsen; Vitamin K: Gerinnung des Blutes. — Das überraschendste Ergebnis dieser Arbeit war nicht so sehr die Besiedlung steriler Mycetocyten mit einer bis jetzt als Symbiont nicht bekannten Hefe, *Torulopsis utilis*, als die Art der Infektion. PANT u. FRAENKEL gelang es 1950 und 1954, die Mycetocyten steriler *Stegobium*-Larven mit Symbionten einer nahe verwandten Gattung, *Lasioderma*, zu infizieren. Aber im Fall von *T. utilis* handelt es sich nicht nur um die Wiederbesiedlung der Mycetocyten, sondern auch um die Infektion sämtlicher Zellen des Mitteldarm-epithels. Das Auffallende dabei ist, daß *alle* besiedelten Zellen des Epithels der Divertikel, wie des übrigen Mitteldarmes ihren Bürstenbesatz behalten. Auch werden die infizierten Blindsackzellen nicht so groß wie bei der Besiedlung mit den arteigenen Symbionten. Die Mitteldarmzellen erleiden überhaupt keine Volumenzunahme. Die Wachstumsimpulse wirken sich somit nur auf die ursprüngliche Zone der Symbiontenwohnstätten in den Blindsäcken aus. Die Vermehrung der Fremdehefen ist sichtlich gehemmt. Mag sein, daß der Stoffwechsel von Wirt und fremdem Eindringling noch nicht harmonisch aufeinander abgestimmt ist, wie das bei allen Symbiosen gewöhnlich der Fall ist. Das Zusammenleben ist noch ein gelockertes und man möchte dabei eher an kommensalistische Verhältnisse denn an einen Parasitismus denken. Es fallen zwar die ursprünglichen Grenzen zwischen den nur für Symbionten reservierten Epithelien der Blindsäcke und dem anschließenden Mitteldarm; fast sämtliche Mitteldarmzellen werden gleichmäßig stark von den Hefen befallen, aber es findet *keine wilde Invasion* statt, wie sie für viele Fälle des Parasitismus typisch ist. Es sind auch sonst keine merklichen Schäden an den Larven festzustellen; im Gegenteil, sie sind jetzt befähigt, sich in Grieß und Weizenmehl ohne Zusatz zur Imago zu entwickeln. Wie der *Tribolium*-Test ergab, sind die drei in Grieß und Weizenmehl fehlenden Vitamine — Pantothensäure, Riboflavin und Nicotinsäure — in *T. utilis* enthalten. Die Infektion steriler *Stegobium*-Larven mit dieser Hefe ersetzt also in dieser Beziehung wohl vollkommen die normalen Symbionten; die mit *T. utilis* infizierten Larven haben dieselbe Entwicklungszeit in Grieß und Weizenmehl ohne Zusatz wie normal infizierte Larven. Auch haben normale und solche als Larven mit *T. utilis* infizierten Imagines dieselbe Lebensdauer.

Die Wiederaufgabe der neu erworbenen „Symbionten“ während der Puppenruhe weist mit Nachdruck darauf hin, daß die Bindungen zwischen Wirt und seinen Gästen in diesem Falle noch recht lockere sind. Es sind die Wege noch nicht geebnet, die normalerweise bei der Reinfektion der imaginalen Blindsäcke von den Symbionten beschritten werden. Sämtliche Insassen des zerfallenden larvalen Darmepithels werden

entweder verdaut oder in der frisch geschlüpften Imago zusammen mit den Resten des Darmes ausgestoßen. Wie diese Arbeit zeigt, besitzen sterile *Stegobium*-Larven eine Immunität gegenüber 14 der 15 getesteten Hefen, und eine Infektion der Mycetocyten mit ihren eigenen Symbionten schützt normale Larven vor einem Eindringen von *T. utilis* in die normalerweise unbesiedelten Zellen des Mitteldarmepithels. Die Hefen kommen überall in der freien Natur vor, und es ist meines Wissens bisher kein Fall bekannt geworden, daß oral aufgenommene Hefen Krankheiten in Insekten hervorriefen. Wie bei anderen Pilzen und Bakterien, müssen die Hefen erst in die Leibeshöhle eindringen, um pathogen zu wirken. BURNSIDE (1930) fütterte Bienen mit *Saccharomyces ellipsoideus* und *S. cerevisiae*, und es entstand eine milde Ruhr. Werden diese Hefen aber ins Blut injiziert, dann sterben die Bienen in der Folge. Leider ist bis heute sehr wenig über eine erworbene Immunität bei Insekten bekannt. Gegen einige in die Körperhöhle injizierte Bakterienarten sind verschiedene Antikörper in Insekten gebildet worden, aber eine nachträglich erworbene Immunität gegen pathogene Protozen und Pilze ist schwer hervorzurufen (STEINHAUS 1947, 1949 und WIGGLESWORTH 1955).

Summary

1. Two methods were used to attempt to infect sterile *Stegobium* larvae: 1. Smearing the eggs with the foreign yeasts and the taking up of the same by the larvae at the time of hatching; 2. mixing the yeasts in the fresh as well as dry state with the food of the young larvae. Only the second way proved successful. Of the 15 yeasts in pure culture (symbiotic yeasts of Cerambycidae and different culture yeasts) a successful infection was obtained only with dried *Torulopsis utilis*. Larvae from sterile eggs, which were smeared with yeast suspensions, died before the first molting on a diet of wheat grit and flour without the addition of yeast extract.

2. The content of vitamins of the B-complex, using *Tribolium confusum* as the test object, was determined in the yeasts, in their substrates both before and after inoculation, in the normal diet (wheat grit and flour), and in the yeast extract.

3. The addition of fresh yeasts to the food of sterile larvae so supplemented the diet of wheat grit and flour that all larvae developed into adults. In no case did an infection of the blind sacs take place.

4. After adding fodder-yeast (*T. utilis* dried) to the diet of the sterile larvae, there followed an infection not only of the blind sac epithelium but also of all epithelial cells of the mid-gut. The addition of other dried yeasts to the food of sterile larvae supplemented the diet to such an extent that all larvae developed into adults, without however becoming infected.

5. Sterile *Stegobium* larvae, to which species specific symbionts and dried *T. utilis* were offered in the food at the same time, took up only their normal symbionts into the mycetocytes of the blind sacs; an infection of the slender epithelial cells of the blind sacs and the epithelium of the mid-gut with *T. utilis* did *not* take place. Normally infected *Stegobium* larvae, to which dried *T. utilis* was offered in the food, were not infected by this yeast.

6. Corresponding to the varying content of vitamins of the B-complex in the yeasts, which were added in the dry state as 5% of the food, different developmental times were obtained: from 32 to 38 days with *Torulopsis albida* to from 60 to 70 days with *Candida mesenterica*. Larvae on diets with *T. utilis* had a growth period of from 34 to 40 days.

7. Those larvae, which were kept for the first two weeks of life on diets with dried *T. utilis* and were then transferred to wheat grit and flour (with nothing added), completed their development only after 51 to 56 days. All of these larvae had become infected with the foreign yeast during the first two weeks.

8. In the adult stage the content of pantothenic acid, riboflavin and nicotinic acid in the diet exerts no apparent effects. The life span of all adults (those normally infected as well as those free of symbionts) is the same in wheat grit and flour both with and without yeast extract.

9. The vitamin content of the food of the parental generation has an effect on the developmental time of the F_1 -generation. If the parents receive *T. utilis* in their larval diets, all F_1 -larvae, hatching from the sterile eggs, develop to adults in wheat grit and flour (without enrichment). However the time of development of this F_1 -generation is noticeably extended. When *Candida mesenterica*, *Endomyces magnusii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pastorianus*, *Torulopsis albida*, *T. jamata* and *Zygosaccharomyces mayor* were added to the food of the parental generation, then only a *small* percent of the sterile F_1 -offspring reached metamorphosis. The other yeasts tested had no influence on the development of the sterile F_1 -larvae; all of which died on diets of wheat grit and flour.

10. The life span of the F_1 -adults, whose parents were raised on diets with *T. utilis*, was 12 to 19 days as compared with 2 to 12 days for adults whose parental generation was fed diets with the above mentioned yeasts.

11. All F_2 -larvae from these experiments died before the first molting, in so far as the F_1 -generation was raised on wheat grit and flour.

12. The histological investigation of the larvae artificially infected with *T. utilis* showed that *all* epithelial cells of the blind sacs of the mid-gut and of the entire mid-gut itself were infected. Therefore that

barrier, which is impenetrable to the normal symbionts, is not set up against these foreign yeasts.

13. Those cells, which always loose their ciliated lining in an infection with their species specific symbionts, retain it in the infection with *T. utilis*.

14. During the pupal rest the newly formed epithelium of the mid-gut is not reinfected by *T. utilis*. The adults are therefore usually sterile. In a few cases the yeast used (*T. utilis*) could be cultured from shredded blind sacs and guts. The egg laying apparatus of the female adults is never infected. Also examination of the mid-guts of the F₁-generation, which was raised on fresh wheat grit and flour, confirmed the fact that no transference of the foreign yeast to the offspring had taken place.

Literatur

Die mit * bezeichneten Schriften standen mir nur in Referaten zur Verfügung.

*ALBRITTON, E. C.: Standard values in nutrition and metabolism. Philadelphia 1955.

ASCHNER, M., u. E. RIES: Das Verhalten der Kleiderlaus bei Ausschaltung ihrer Symbionten. Eine experimentelle Symbiosestudie. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **26**, 259—590 (1933).

BEWIG, F., u. W. SCHWARTZ: Untersuchungen über die Symbiose von Tieren mit Pilzen und Bakterien. Arch. Mikrobiol. **24**, 174—208 (1956).

BLEWETT, M., and G. FRAENKEL: Intracellular symbiosis and vitamin requirements of two insects, *Lasioderma serricorne* and *Sitodrepa panicea*. Proc. roy. Soc. B **132**, 212—221 (1944).

BRECHER, G., and V. B. WIGGELSWORTH: The transmission of *Actinomyces rhodnii* Erikson in *Rhodnius prolixus* Stal. (Hemiptera) and its influence on the growth of the host. Parasitology **35**, 220—224 (1944).

BREITSPRECHER, E.: Beiträge zur Kenntnis der Anobiidensymbiose. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **11**, 495—538 (1928).

BROOKS, M. A., and A. G. RICHARDS: Intracellular symbiosis in cockroaches. I. Production of aposymbiotic cockroaches. Biol. Bull. **109**, 22—39 (1955).

BUCHNER, P.: Studien an intracellularen Symbionten. III. Die Symbiose der Anobiiden mit Hefepilzen. Arch. Protistenk. **42**, 319—326 (1921).

— System und Symbiose. Verh. dtsch. zool. Ges. **29**, 48—54 (1924).

— Endosymbiose der Tiere mit pflanzlichen Mikroorganismen. Basel u. Stuttgart 1953.

*BURNSIDE, C. E.: Saphrophytic fungi associated with the honey bee. U.S. Dept. Agric. techn. Bull. **149** (1930).

ESCHERICH, K.: Über das regelmäßige Vorkommen von Sproßpilzen in dem Darm-epithel eines Käfers. Biol. Zbl. **20**, 350—358 (1900).

FRAENKEL, G., and M. BLEWETT: The vitamin B-complex requirements of several insects. Biochem. J. **37**, 686—692 (1943).

FRANK, W.: Einwirkung verschiedener Antibiotica auf die Symbionten der Küchenschabe *Blatta orientalis* L. und die dadurch bedingten Veränderungen am Wirtstier. Ver. dtsch. Zool. Ges. Tübingen 1954. 381—388 (1954/55).

— Entfernung der intracellularen Symbionten der Küchenschabe (*Periplaneta orientalis* L.) durch Einwirkung verschiedener Antibiotica, unter besonderer

- Berücksichtigung der Veränderungen am Wirtstier und an den Bakterien. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **44**, 329—366 (1956).
- FROBISHER, M.: Fundamentals of microbiology, 5th edit. Philadelphia 1953.
- FRÖBRICH, G.: Darstellung von Konzentrat des „*Tribolium*-Imago-Faktors“ (TIF) und seine vermutliche chemische Natur. Naturwissenschaften **40**, 344 bis 345 (1953a).
- Der „*Tribolium*-Imago-Faktor“ durch Carnitin ersetzbar. Naturwissenschaften **40**, 556 (1953b).
- , u. K. OFFHAUS: Der qualitative Vitamintest mit dem Reismehlkäfer *Tribolium confusum* Duv. (Tenebrionidae, Coleoptera) als Testorganismus. Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch. **5**, 358—369 (1953).
- GEIGY, R., L. A. HALFF u. V. KOCHER: Untersuchungen über die physiologischen Beziehungen zwischen einem Überträger der Chagas-Krankheit *Triatoma infestans* und dessen Darmsymbionten. Schweiz. med. Wschr. **83**, 928 (1953).
- GRAEBNER, K. E.: Vergleichend morphologische und physiologische Studien an Anobiiden- und Cerambycidensymbionten. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **41**, 471 bis 528 (1954).
- HALFF, L. A. Untersuchungen über die Abhängigkeit der Reduviide *Triatoma infestans* Klug von ihren Darmsymbionten. Acta trop. (Basel) **13** (1956).
- HALLER, G. DE: La symbiose bactérienne intracellulaire chez la blatte, *B. germanica*. Arch. Sci. (Genève) **8**, 229—306 (1955).
- JURZITZA, G.: Physiologische Untersuchungen an Cerambycidensymbionten. Arch. Mikrobiol. **33**, 305—332 (1959).
- KARAWAIEW, W.: Über Anatomie und Metamorphose des Darmkanals der Larve von *Anobium paniceum*. Biol. Zbl. **19**, 122—130, 161—171, 196—202 (1899).
- KAUDEWITZ, H.: Die Wuchsstoffverteilung im larvalen Fettkörper von *Tenebrio molitor*. Z. vergl. Physiol. **35**, 380—415 (1953).
- KOCH, A.: Über das Verhalten symbiontenfreier *Sitodrepa*-Larven. Biol. Zbl. **53**, 199—203 (1933a).
- Über künstlich symbiontenfrei gemachte Insekten. Verh. dtsh. zool. Ges. **35**, 143—150 (1933b).
- Wachstumsfördernde Wuchsstoffe der Hefe. Naturwissenschaften **28**, 24—27 (1950).
- Symbionten als Vitaminquellen der Insekten. Forsch. Fortschr. dtsh. Wiss. **28**, 33—37 (1954).
- Das Verhältnis zwischen Symbiont und Wirt. Verh. dtsh. Zool. Ges. in Erlangen 1955. 328—348 (1955).
- The experimental elimination of symbionts and its consequences. Exp. Parasit. **5**, 481—518 (1956).
- Die physiologische Bedeutung der Symbionten für den Wirtsorganismus. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med., 63. Kongr., S. 56—64, 1957.
- LIPKE, H., and G. FRAENKEL: Insect nutrition. Ann. Rev. Entomol. **1**, 17—44 (1956).
- LUND, A.: Studies on the ecology of yeasts. Copenhagen 1954.
- MÜLLER, H.: J. Experimentelle Studien an der Symbiose von *Coptosoma scutellatum* Geoffr. (Hem. Heteropt.). Z. Morph. u. Ökol. Tiere **44**, 459—482 (1956).
- PANT, N. C., and G. FRAENKEL: The function of the symbiotic yeasts of two insect species, *Lasioderma serricorne* F. and *Stegobium* (*Sitodrepa*) *paniceum* L. Science **112**, 498—500 (1950).
- Studies on the symbiotic yeasts of two insect species, *Lasioderma serricorne* F. and *Stegobium paniceum* L. Biol. Bull. **107**, 420—432 (1954).

- REYNOLDS, J. M.: On the inheritance of food effects in a flour beetle, *Tribolium destructor*. Proc. Roy. Soc. B **132**, 438—451 (1945).
- RIPPEL-BALDES, A.: Grundriß der Mikrobiologie, 2. Aufl. Berlin 1952.
- ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik, 15. Aufl. München 1948.
- RUDOLPH, W.: Vitamine der Hefen. Stuttgart 1948.
- SCHNEIDER, H.: Morphologische und experimentelle Untersuchungen über die Endosymbiose der Korn- und Reiskäfer (*Calandra granaria* L. und *Calandra oryzae* L.). Z. Morph. u. Ökol. Tiere **44**, 555—625 (1956).
- SCHWARZ, I., u. A. KOCH: Vergleichende Analyse der wichtigsten Wachstumsvitamine des Blütenpollens, nebst einer Bemerkung über die Verteilung der Vitamine in Buchensämlingen. Wiss. Z. Univ. Halle, math.-nat. Beih. **4**, 7 bis 20 (1954).
- STEINHAUS, E. A.: Insect microbiology. New York: Ithaca 1947.
- Principles of Insect Pathology. New York 1949.
- WIGGLESWORTH, V. B.: Physiologie der Insekten. Basel u. Stuttgart 1955.
- WOLF, C.: Über konzentrische Strukturen im Eikern von Coleopteren. Arch. Zellforsch. **16**, 443—462 (1922).

Dr. FRANCIS FOECKLER,

Apt. 333, 1535-West Falkland Jane Silver Spring, Maryland U. S. A.

Lebenslauf

Am 26. Juni 1926 wurde ich, FRANCIS HENRY FOECKLER, als Sohn des Elektrikers FRANCIS HENRY und seiner Ehefrau ELISABETH FOECKLER, geborene MORIARTY, in Washington, D. C., Vereinigte Staaten von Nordamerika, geboren. Ich besuchte von September 1932 bis Juni 1937 die St. Anthony's Grade School, von September 1937 bis Juni 1939 die St. Aloysius' Grade School und von September 1939 bis Juni 1943 die Gonzaga High School in Washington, D. C., die ich mit dem High School Diplom verließ. Von September 1943 bis Juni 1945 studierte ich Literatur am St. Joseph's College in Callicoon, New York. Nach Beendigung meiner Militärzeit im September 1947 begann ich das Studium der Naturwissenschaften an der Catholic University of America in Washington, D. C. Ich wechselte September 1948 zum St. Peter's College in Jersey City, New Jersey über, wo ich im Juni 1950 meine Prüfungen zum "Bachelor of Arts" ablegte. Von Juni 1950 bis Juni 1952 besuchte ich wieder die Catholic University of America in Washington, D. C., an der ich im Juni 1952 auf Grund einer wissenschaftlichen Arbeit über "The Effects of Thiourea on the Blood Picture of the White Rat", mein Studium mit Erlangen des "Master of Science" abschloß. Bis August 1954 arbeitete ich als Bakteriologe in einer diagnostischen Klinik und im Forschungslabor der Armee. Nach einem Briefwechsel mit Herrn Professor KARL RITTER VON FRISCH immatrikulierte ich mich im November 1954 an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München, wo ich im Hauptfach Zoologie und in den Nebenfächern Bakteriologie und Chemie studierte. Mein Studiumsabschluß in Deutschland ist die Promotion zum Doktor der Naturwissenschaften.

